



**HAL**  
open science

# Evaluation de différentes stratégies thérapeutiques antisens pour le traitement de la maladie de Huntington

Marine Imbert

► **To cite this version:**

Marine Imbert. Evaluation de différentes stratégies thérapeutiques antisens pour le traitement de la maladie de Huntington. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLV044 . tel-01617775

**HAL Id: tel-01617775**

**<https://theses.hal.science/tel-01617775>**

Submitted on 17 Oct 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2017SACLV044

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE DE VERSAILLES-SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

ECOLE DOCTORALE N° 569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie

Par

**Madame Marine IMBERT**

Evaluation de différentes stratégies thérapeutiques antisens  
pour le traitement de la maladie de Huntington

**Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 8 septembre 2017 :**

**Composition du Jury :**

M. Leumann Christian	Professeur, University of Bern	Président
Mme Déglon Nicole	Professeur associé, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)	Rapporteur
Mme Lorain Stéphanie	Responsable de groupe, Centre de Recherche en Myologie UMRS 974	Rapporteur
M. Perrier Anselme	DR, Inserm/UEVE UMR86	Examineur
M. Bemelmans Alexis	Ingénieur, Molecular Imaging Research Center CEA	Examineur
Mme Goyenvalle Aurélie	CR1, Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines	Directrice de thèse



*“Everybody is a genius.  
But if you judge a fish by its ability to climb a tree,  
it will live its whole life believing that it is stupid.”*

*A. Einstein*





# Remerciements



Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Nicole Déglon et le Dr. Stéphanie Lorain pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ma thèse, et également le Pr. Christian Leumann, le Dr. Anselme Perrier et le Dr. Alexis Bemelmans de l'avoir examinée. C'est vraiment un honneur pour moi que vous jugiez mes travaux.

Je tiens ensuite à te remercier Aurélie pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans ton équipe. Je me rappelle comme si c'était hier de notre premier entretien sur skype. Merci de m'avoir proposé un sujet aussi passionnant, transversal, appliqué, mais surtout un projet à monter moi-même. Même si ça n'a pas été facile, ça a été tellement enrichissant que je ne regrette rien. Merci de m'avoir laissé cette liberté, tout en gardant toujours ta porte ouverte. J'ai également beaucoup apprécié que tu me donnes l'opportunité d'assister à différents congrès, à Helsinki, à Leiden, à Malte... Je te remercie aussi de m'avoir redonné des coups de boost quand j'en avais besoin, en gommant mes doutes et en calmant mes déceptions et frustrations. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci. (Et n'oublie pas de te demander régulièrement : Are you happyyy ?^^).

Luis, merci tout d'abord de m'avoir permis d'intégrer ton unité et merci surtout pour tous tes conseils. J'ai adoré ces conversations enflammées sur cette fameuse huntingtine, des milliers d'idées à la seconde, mais malheureusement pas assez de temps pour explorer toutes ces pistes... Merci également pour la confiance que tu m'as témoignée en me proposant d'organiser le séminaire de l'unité, même si c'était stressant, c'était très enrichissant !

Merci à toutes les personnes présentes dans le bâtiment, Fedor, pour ton aide sur la purification d'AAV, Helge, M'barka, pour tes pâtisseries, Sabine, Thérèse et Stéphane, qui m'ont prêté un bout de paillasse à mon arrivée.

Rachid, un chercheur, enfin un directeur scientifique pardon, en or ! Merci pour ta bonne humeur, et pour ton savoir que tu partages avec plaisir ! Tu as été très patient et tu m'as beaucoup appris en vecto notamment (et à me « mettre confort » ahah), je me rappelle de ces dures semaines enfermées dans le L3..! Merci aussi pour ton aide administrative, dossier OGM, rédaction de thèse etc... et pour m'avoir proposé d'animer à tes côtés le TP pour les secondes, c'était vraiment une jolie expérience pour moi ☺ Ah oui et j'allais oublier, merci pour ces 3 ans de pains (pas cuits de préférence^^) !!



Val, je te remercie d'abord de rester la personne gentille et vraie que tu es. Tu as un cœur en or et une sensibilité qui me touche beaucoup. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, m'avoir fait rire tout aussi bien que sécher mes larmes, avoir gardé mes secrets et en cette fin de thèse merci d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit ! Merci aussi de gérer tous les problèmes du labo, d'eau en panne, de ménage, de saisines, de commandes..., une vraie lab manager ;) Et enfin merci de nous mettre de l'huile essentielle déstressante dans le bureau =)

Lucía (t'as vu j'ai bien mis l'accent hein), merci pour ta bonne humeur, ton calme et tes conseils toujours apaisants !! C'était vraiment super de pouvoir travailler à tes côtés, on a bien ri et toi et ta famille trop chou allez beaucoup me manquer ☺

Florence, merci beaucoup pour ton aide pour les injections stéréotaxiques et le sacrifice des souris. Cela m'a vraiment fait du bien d'avoir un soutien pour *l'in vivo*, sans toi je n'aurais pas pu avoir autant de souris injectées.

Charly, mon médecin préféré ☺ Merci pour ces retours en voiture à base de *Vivo per lei*, ces discussions passionnantes autour d'un café, et tes remontages de moral quand j'en avais besoin, ça fait du bien ta vision de bisounours ! Et évidemment un merci aussi à ton chéri Jojo, mon deuxième médecin préféré ;) Vous m'avez bien fait rire pendant ces deux ans et j'espère que vous viendrez me voir à Clichy ☺

Un grand merci également à Marc, même si les débuts ont été difficiles, nous avons réussi à communiquer et ton aide sur les WB (HD comme tu dis^^) a été top ! Tu as vraiment géré, je n'aurais jamais réussi à tout avoir à temps sans toi, j'espère que ton stage t'aura plu !

Amalia, à mon arrivée au labo tu étais dans une période très stressante : la fin de ta thèse, et maintenant je comprends !! Je te remercie pour nos discussions, notamment sur l'après-thèse, et je te souhaite de t'épanouir dans ton futur ☺ (et vivement que tu te coupes les cheveux ;) hihi)

Faouzi et ton fameux « j'finis un truc et j'arrive », mais toujours dispo pour aider (tant qu'il y a du peps et/ou un gâteau au chocolat), merci pour ta patience pour m'apprendre la stéréotaxie. Bon courage pour la fin de ta thèse, mais je ne me fais pas de souci pour toi ;) !

Antoine, bien que rarement présent à Saint Quentin, merci pour ta bonne humeur et pour les services que tu m'as rendus !

Quentin, ton incrédulité me fera toujours rire, mais surtout ne change rien t'es au top ! Bon courage pour ta thèse, tu seras un grand chercheur j'en suis sûre !!

Evidemment, un gros merci au B02.014 ! Les filles, sans vous l'aventure n'aurait pas été la même c'est sûr ! Quelques lignes ne suffiront pas à résumer ces trois années passées avec vous, car oui, il s'en est passé des choses dans ce bureau, des éclats de rire (hein les garçons d'à côté ☺), des déménagements et de la déco d'intérieur, des gâteaux, des mesures corporelles, des expressions franco-algéro-brésiliennes, des potins, des pleurs et encore des gâteaux. Et en dehors du labo : les soirées blind-test à Chacha, bières à Boulogne et thé à la menthe à Suresnes, et bien sûr pour toutes nos aventures Maltaises ! Merci pour tous ces moments les filles, vous êtes des amies en or. Soso, tu as été un vrai pilier pour moi pendant ces 3 ans. Merci pour tous tes conseils sur mon projet, pour la rédaction et aussi pour l'enseignement, pour nos cafés au lait et nos frites sauce ketchup mayo bien dosée, pour nos trajets quotidiens si bien synchronisés... Fifoux, guide exceptionnelle faut avouer (sans parler du fameux bus X3 ;) ), merci pour ta bonne humeur, tous les gâteaux que tu nous prépares et ton teint de vahiné (merci l'activateur hein !) et courage pour la suite de l'aventure... ! Gabita, un rayon de soleil brésilien, merci pour ta folie, ton petit accent, ta pyromanie, ta venue à 22h30 à ma porte, ton cross-combat-cross du samedi matin... La liste est longue ! Une chose est sûre, je ne vous oublierai pas et je compte bien vous garder dans ma vie encore longtemps (bisous de 🍷)

Merci à tous les doctorants (et à vous aussi les post-docs Amalia, Mina et Sonia) du Journal Club, c'était vraiment sympa de se retrouver le lundi soir, et encore plus quand on allait au bar ensuite ;)

Cycy, le roi de la BM, je te remercie de m'avoir montré comment faire (et réussir surtout) les clonages (merci à ta pièce magique d'ADN ;) ). Et puis, un grand merci puisque sans toi je serai toujours enfermée dans la chambre froide...!

Olivier, merci pour nos conversations en salle de culture (tu m'auras bien fait rire à toujours croire à toutes les bêtises que j'ai pu te raconter^^) et merci aussi pour les barbecues en été avec ta jolie famille ☺

PO, sacré binôme de ménage, merci pour tes blagues toujours plus subtiles et pour ton aide dans le L3.

Graziella, merci pour tes conseils surtout dans la première moitié de ma thèse où j'ai eu tant de mal à mettre au point le western pour la huntingtine...

Aurélie A., je te remercie pour toutes ces discussions (scientifiques mais aussi sur la recherche en général) que nous avons eues, j'ai beaucoup aimé interagir avec toi et j'ai beaucoup appris.

Benoit, tu me feras toujours rire (surtout quand je pense à toi au Attack^^), merci pour nos discussions dans ton bureau ou au sport, et plein de bonheur avec ta petite famille.

Jakub, j'espère que tu t'en sors avec la fin de ta thèse en Allemagne, courage... ! Merci pour tes conseils sur les AAV notamment.

Merci à tous les stagiaires pour leur bonne humeur : Yanis, Gauthier, Alix, Victor, Dorsa et Chloé.

Un gros merci aux sportifs du midi, Aurélie, Gabi, Soso, Philippine, Olivier, Benoît, Cyriaque, Lucía et Malika, c'était top de pouvoir se défouler avec vous, un petit combat et ça repart ;) )

Merci à toutes les personnes qui s'occupent de l'animalerie, malgré les différents problèmes indépendants de votre volonté, vous avez toujours fait votre maximum pour prendre soin des souris et pour que nos manip soient réalisées dans les meilleures conditions. En particulier merci à Aude et à Sandrine pour tout le mal que vous vous donnez...

Merci également à Rana, Delphine, Julie et Patricia pour votre bonne humeur.

Merci à Saïd de faire tourner la laverie, de faire en sorte que l'on ne manque de rien et que l'on soit dans de bonnes conditions de travail.

Merci à toutes les personnes de l'administration qui facilitent notre vie au quotidien : Sophie, merci pour ton accueil, pour ton soutien, pour ta bonne humeur, j'espère que tu es bien à Versailles mais tu nous manques trop ici ! Merci à Julien, Gwenaël et Fabrice pour votre efficacité sur les commandes qui sont parfois urgentes. Merci également à Isabelle Homont qui m'a accompagnée durant tout le processus administratif de ma thèse et qui a su faire le nécessaire en temps et en heure.

Merci également à Maurice pour avoir passé une semaine à Paris pour nous apprendre la délicate technique de poses de canules pour faire des injections répétées.

Merci à Alexis Bemelmans pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et à Gwenaëlle Auregan et Audrey Vautheny pour m'avoir gentiment montré leur manière de faire les injections stéréotaxiques.

Merci à Denis Furling pour avoir accepté d'examiner mes travaux lors du comité de suivi de thèse et pour les conseils qu'il m'a donnés.

Merci à Jean-Marc Corsi de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié une mission d'enseignement.

Merci à mes deux groupes de TD de L1 de bio avec qui j'ai pris grand plaisir à travailler pendant un semestre. Vous avez été géniaux et m'avez fait découvrir le métier passionnant d'enseignant. J'ai vraiment eu l'impression d'avoir aidé certains d'entre vous, alors merci pour vos mercis.

Merci à mes anciens maitres de stage qui m'ont transmis leur passion et ont confirmé mon envie de faire une thèse : Miguel, Chloé, Malek, Mickael, Adil.

Merci à mes copines de m'avoir soutenue et d'avoir compris mon indisponibilité de ces derniers temps... Mel c'était vraiment top de te retrouver à Paris pour nos brunchs/apéros/soirées enflammées, j'ai hâte de venir te voir à Bordeaux ! Marine, merci pour toutes nos sorties, notamment le fameux combo crêpes + ICC du mardi soir ☺ Du collègue au doctorat, tu auras été à mes côtés, et ce n'est pas prêt de s'arrêter ! Lisa, merci pour tous ces apéros sur ton balcon, ces raclettes racontage de vie, et les soirées alcoolisées. Ben & Emilie, merci pour ces escape-games de folie, on est vraiment trop balaiz' ! Léa, merci pour tes venues à Paris, merci de me faire voyager en me montrant tes photos et en me racontant tes péripéties. J'espère qu'un jour on sera dans la même ville à nouveau (ou déjà dans le même pays ;) ). JoubJoub et Agnès, merci pour tous ces moments passés ensemble, ces week-ends à Lisbonne, Lyon, Paris (enfin Chacha), Freiburg, Nice, Collonges... Larisse, ton passage à Paris était vraiment super chouette et je suis nostalgique de nos repas Poulet rôti du marché pommes de terre et fraises du dimanche midi. Chouchou, c'était top de te retrouver à Paris, on se sera bien marré ! Mais ça y est maintenant c'est sûr : « Plus jamaiiiiis » ! Livia et Nicolas, futurs voisins, hâte de faire la rencontre de Bébé... ! Mathilde et Antoine, nos skypes depuis la Guadeloupe ont apporté un peu de soleil dans notre vie parisienne, mais revenez vite ! Margaux et Yoann, c'était top notre week end à Paris, et ça fait plaisir de vous voir de temps en temps à Clermont, Charlotte et Alexis, je vous souhaite plein de bonheur dans votre vie Lyonnaise ☺

Enfin, je tiens évidemment à remercier ma famille, mes parents qui ont toujours cru en moi, qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout de mes rêves (et c'est pas fini ;) ), sans trop savoir pourquoi mes rêves riment avec thèse. Vous avez toujours fait en sorte que je sois dans les meilleures conditions pour réussir, merci pour votre soutien, pour les week-ends ressourçants, pour vos mots rassurants. Je vous aime.

Un merci particulier à ma maman pour la relecture de ce manuscrit.

Mon frère, j'espère que les années à venir te souriront...

Je remercie également mes grands-parents et ma tante Isa, j'ai adoré votre venue à Paris, et j'ai hâte des prochaines vacances où vous me parlerez d'étoiles en boustrophédon.

Merci également à ma mémé qui m'a toujours apporté son soutien infailible et qui a toujours cru en moi.

Merci à ma cousine et à ta petite famille, les week-ends à la campagne à ranger du bois m'ont fait beaucoup de bien ! Et tes deux loulous m'ont bien reboostée avec leurs fous rires et leurs câlins.

Merci à mon autre cousine, nouvellement New Yorkaise, la première Dr. de la famille, pour ton soutien et pour m'avoir montré que si, c'était faisable.

Une grosse pensée à mon cousin, soutenir ma thèse le jour de ta fête va me porter bonheur j'en suis sûre...

Merci à ma belle-famille, pour les week-ends pouponnage, pétanque et tartes aux pommes, vous avez rendu ma thèse plus facile.

Et enfin, un grand merci à ma moitié. Il y a tellement de choses pour lesquelles je voudrais te remercier... Merci pour nos week-ends Labo-Ciné-MacDo, merci pour ta patience quand je me plains le soir de mes manips qui n'ont pas marché, merci de me faire rire au quotidien et de m'avoir emmené loin de tout quand j'en avais besoin. Tout particulièrement en cette fin de thèse, merci de m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi, d'avoir géré la maison et surtout d'avoir corrigé et re-corrige ce manuscrit. Promis, l'année prochaine, c'est à mon tour de t'aider !

**Un grand merci à tous !!!**





## Sommaire

Remerciements .....	2
Sommaire .....	10
Liste des abréviations.....	14
Liste des figures et tableaux.....	17
Introduction .....	20
I.    La maladie de Huntington .....	22
A.  Historique .....	22
B.  Epidémiologie .....	24
C.  Symptômes .....	24
1.  Troubles moteurs .....	24
2.  Troubles cognitifs .....	25
3.  Troubles comportementaux .....	25
4.  Autres symptômes.....	25
D.  Physiopathologie .....	26
1.  Neuropathologie.....	26
2.  Le gène <i>HTT</i> .....	29
3.  Fonctions de la huntingtine physiologique .....	30
a.  La huntingtine à travers l'évolution .....	30
b.  La structure de la huntingtine.....	30
c.  Les interactions de la huntingtine .....	31
d.  La localisation de la huntingtine .....	32
e.  La huntingtine sous toutes ces formes .....	32
f.  Et si on diminue le niveau d'expression de la huntingtine ?.....	33
g.  Et si on augmente l'expression de la huntingtine ? .....	34
4.  Propriétés de la huntingtine mutée .....	34
a.  Quels sont les mécanismes cellulaires impactés ?.....	34
i.  Mauvais repliement et agrégation.....	35
ii.  Défaut de clairance .....	36
iii.  Clivage protéolytique .....	36
iv.  Dérégulation transcriptionnelle .....	36
v.  Dysfonction mitochondriale.....	37
vi.  Détérioration du transport axonal.....	37
b.  Une question subsiste : La MH, gain ou perte de fonction ?.....	38
i.  Gain de fonction.....	38



ii. Perte de fonction .....	39
E. Modèles animaux.....	40
1. Modèles transgéniques de rongeurs contenant la partie 5' du gène <i>HTT</i> .....	41
2. Modèles transgéniques de rongeurs contenant l'intégralité du gène <i>HTT</i> .....	42
3. Modèles <i>knock-in</i> de rongeurs.....	43
4. Grands modèles animaux.....	44
II. Traitements et essais thérapeutiques en cours .....	45
A. Agents pharmacologiques.....	45
1. Agir sur l'autophagie .....	46
2. Agir sur les molécules chaperonnes.....	47
3. Cibler l'activité des caspases.....	47
4. Inhiber les HDAC .....	47
5. Agir sur les kinases .....	48
6. Inhiber les phosphodiésterases .....	49
7. Réguler la voie de signalisation des MAPK .....	49
8. Réguler la voie de signalisation de la kynurénine.....	49
9. Inhiber la voie de signalisation de la sémaphorine 4D (SEMA4D) .....	50
10. Moduler la réponse immunitaire .....	50
11. Diminuer l'excitotoxicité en agissant sur le glutamate.....	50
12. Rétablir les dysfonctions mitochondriales.....	51
13. Augmenter la quantité de BDNF .....	51
B. Thérapie cellulaire.....	52
1. Les cellules fœtales .....	52
2. Les cellules souches pluripotentes.....	52
C. Thérapie génique .....	55
1. Les vecteurs viraux.....	55
a. Les lentivirus .....	55
b. Les adénovirus .....	56
c. Les AAV .....	56
2. Les transgènes à effet thérapeutique .....	57
a. Les facteurs neurotrophiques.....	57
b. Les protéines chaperonnes.....	58
c. PA28 $\gamma$ , un activateur du protéasome .....	59
d. Le cholestérol.....	59
3. Les approches de genome editing .....	59
a. Les protéines à doigt de zinc .....	59

b.	Le système CRISPR/Cas9 .....	59
D.	Le mécanisme d'ARN interférence .....	61
1.	Diminution du gène de manière allèle non spécifique.....	63
2.	Diminution du gène de manière allèle spécifique.....	64
a.	En ciblant les SNP .....	64
b.	En ciblant les répétitions CAG .....	64
E.	Les oligonucléotides antisens .....	65
III.	Les stratégies antisens comme outils thérapeutiques.....	66
A.	Les oligonucléotides antisens .....	66
1.	Modifications chimiques .....	66
2.	Tricyclo-DNA : un nouvel analogue nucléotidique aux propriétés prometteuses .....	68
3.	Mécanismes d'action des ASO.....	68
4.	Les ASO pour la MH .....	70
a.	Inactivation du gène de manière allèle non spécifique .....	71
b.	Inactivation du gène de manière allèle spécifique .....	73
i.	En ciblant les SNP .....	73
ii.	En ciblant les répétitions CAG .....	74
c.	Diminution du clivage de la protéine par saut d'exon .....	76
B.	Un système vectorisé : le U7snRNA.....	77
1.	Fonction physiologique des snRNA .....	77
2.	Utilisation des snRNA comme outil thérapeutique.....	78
	Objectifs et méthodologie .....	82
	Résultats.....	88
I.	Evaluation <i>in vitro</i> des approches antisens.....	90
A.	Diminution du clivage de la protéine par saut d'exon .....	90
1.	Utilisation d'oligonucléotides antisens synthétiques.....	90
a.	Dessin des séquences antisens .....	90
b.	Efficacité des oligonucléotides antisens synthétiques.....	92
2.	Utilisation d'une approche vectorisée .....	95
a.	Dessin des séquences antisens vectorisées .....	95
b.	Efficacité des approches antisens vectorisées .....	98
B.	Inactivation spécifique du gène <i>HTT</i> muté, en ciblant les répétitions CAG .....	102
1.	Utilisation d'oligonucléotides antisens .....	102
2.	Utilisation d'une approche vectorisée .....	104
C.	Inactivation allèle non spécifique du gène <i>HTT</i> .....	107

1.	Utilisation d'oligonucléotides antisens .....	107
D.	Recherche de biomarqueurs <i>in vitro</i> .....	111
II.	Evaluation <i>in vivo des approches antisens</i> .....	113
A.	<i>Silencing</i> allèle spécifique, en ciblant les répétitions CAG.....	113
1.	Utilisation d'oligonucléotides antisens .....	113
2.	Utilisation d'une approche vectorisée .....	115
B.	<i>Silencing</i> allèle non spécifique .....	118
1.	Utilisation d'oligonucléotides antisens .....	118
	Discussion .....	126
I.	Stratégie de saut d'exon .....	128
II.	<i>Silencing</i> allèle non spécifique.....	131
III.	<i>Silencing</i> allèle spécifique en ciblant les répétitions CAG .....	133
IV.	Les modèles animaux de la MH et leurs limitations.....	136
V.	Les biomarqueurs .....	137
VI.	TcDNA et AAV-U7snRNA : avantages et inconvénients.....	138
	Conclusion et Perspectives .....	142
	Bibliographie.....	146
	Annexes .....	174
I.	Fiches techniques .....	176
A.	N°1 : Construction des U7snRNA modifiés .....	176
B.	N°2 : Production de vecteurs lentiviraux .....	181
C.	N° 3: Production de vecteurs AAV .....	182
D.	N°4 : Culture de fibroblastes .....	183
E.	N°5 : Transfection et transduction de fibroblastes .....	184
F.	N°6 : Génotypage .....	185
G.	N°7 : Injection intracérébroventriculaire (ICV) .....	186
H.	N°8 : Extraction d'ARN à partir de cellules/tissus .....	187
I.	N°9 : Analyse par RT-PCR .....	188
J.	N°10 : Analyse par PCR quantitative .....	191
K.	N°11 : Extraction de protéines à partir de cellules/tissus.....	192
L.	N°12 : Western Blot.....	193
II.	Revue publiée dans le journal Genes .....	194
III.	Résumé soumis à la 12ème conférence CHDI – Malte.....	213

## Liste des abréviations

<b>2 'O</b>	2'O-méthyl
<b>2' O-MOE</b>	2'O-méthoxyéthyl
<b>3-NPA</b>	Acide 3-nitropropionique
<b>AA</b>	Acide Aminé
<b>AAV</b>	Adeno Associated Virus
<b>Acb</b>	Noyau accumbens
<b>Ad</b>	Adénovirus
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AON</b>	Antisens OligoNucleotide
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ASDS</b>	Sites Accepteurs et Donneurs
<b>ASO</b>	Antisense Oligonucleotide
<b>BACHD</b>	Bacterial Artificial Chromosome Huntington's Disease
<b>BDNF</b>	Brain-Derived Neurotrophic Factor
<b>BHE</b>	Barrière Hémato-Encéphalique
<b>BP</b>	Branching Point
<b>CAG</b>	Triplet Cytosine Adénine Guanine
<b>CBP</b>	CREB-binding protein
<b>CMA</b>	Autophagie Médiée par les protéines Chaperonnes
<b>CN</b>	Noyau caudé
<b>CNTF</b>	Ciliary neurotrophic factor
<b>CTG</b>	Cytosine Thymine Guanine
<b>Da</b>	Dalton
<b>DARPP-32</b>	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein
<b>DICS</b>	Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié à l'X
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNase</b>	DésoxyriboNucléase
<b>EEAT2</b>	Excitatory Amino Acid Transporter 2
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases
<b>ESE</b>	Exonic Splicing Enhancer
<b>ESS</b>	Exonic Splicing Silencer
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>GABA</b>	Acide Gamma-AminoButyrique
<b>GB</b>	Ganglions de la Base
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GPe</b>	Globus Pallidus externe
<b>GPi</b>	Globus Pallidus interne
<b>GRMD</b>	Golden Retriever Muscular Dystrophy
<b>Hdh</b>	Gène murin codant pour la huntingtine
<b>HAT</b>	Histone AcétylTransférase
<b>HDAC</b>	Histone Désacétylase
<b>HEAT</b>	Huntingtine, facteur d'Elongation 3, protéine phosphatase 2A et kinase TOR1
<b>hnRNP</b>	heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>HTT</b>	Gène humain codant pour la huntingtine

<b>HTT</b>	Protéine Huntingtine (murine ou humaine)
<b>ICV</b>	IntraCérebroVentriculaire
<b>iPSC</b>	induced Pluripotent Stem Cell
<b>ISS</b>	Intronic Splicing Silencer
<b>IT15</b>	Interesting Transcript 15
<b>ITR</b>	Inverted Terminal Repeat
<b>ICV</b>	IntraCérébroVentriculaire
<b>IV</b>	IntraVenous
<b>JNK</b>	c-Jun terminal kinases
<b>KA</b>	Acide Kynurénique
<b>KMO</b>	Kynurénine MonoOxygénase
<b>KD</b>	Knock-down
<b>KI</b>	Knock-In
<b>KO</b>	Knock-Out
<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>LNA</b>	Locked Nucleic Acids
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MBNL1</b>	MuscleBlind-Like 1
<b>MH</b>	Maladie de Huntington
<b>MHJ</b>	Maladie de Huntington Juvénile
<b>MLV</b>	Murine leukemia virus
<b>MSN</b>	Medium Spiny Neurons
<b>mTOR</b>	Mammalian Target Of Rapamycin
<b>muHTT</b>	Protéine huntingtine mutée
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium
<b>NES</b>	Signal d'Export Nucléaire
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor-Kappa B
<b>NMD</b>	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>NRSE</b>	Neuron Restrictive Silencer Element
<b>NS</b>	Non Spécifique
<b>NSC</b>	Neural Stem Cell
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PAM</b>	Protospacer-Adjacent Motif
<b>PC</b>	Poids du Cerveau
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDE</b>	PhosphoDiEstérase
<b>PEI</b>	PolyEthylenImine
<b>PLCB4</b>	PhosphoLipase C Beta 4
<b>PMO</b>	Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers
<b>PNA</b>	Peptide Nucleic Acids
<b>PRD</b>	Domaine Riche en Prolines
<b>PS</b>	Phosphorotioate
<b>Put</b>	Putamen
<b>QA</b>	Acide Quinolinique
<b>REST/NRSF</b>	Repressor Element-1 Transcription factor/Neuron Restrictive Silencer Factor

<b>RISC</b>	RNA-Induced <i>Silencing</i> Complex
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RNase</b>	RiboNucléase
<b>ROCK1</b>	RhO-associated, Coiled-coil-containing protein Kinase 1
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>scAAV</b>	self complementary Adeno-Associated Virus
<b>shRNA</b>	small hairpin RNA
<b>SEMA4D</b>	sémaphorine 4D
<b>SMA</b>	Spinal Muscular Atrophy
<b>SMN</b>	Survival Motor Neuron
<b>SNc</b>	Substance Noire <i>pars compacta</i>
<b>SNr</b>	Substance Noire <i>pars reticula</i>
<b>SNP</b>	Single-Nucleotide Polymorphism
<b>snRNA</b>	Small nuclear RiboNucleic Acid
<b>snRNP</b>	small nuclear RiboNucleoProtein
<b>STN</b>	Noyau Sous-Thalamique
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>Tc</b>	Tricyclo-ADN
<b>TFF</b>	Filtration à Flux Tangentiel
<b>TOR1</b>	Target Of Rapamycin 1
<b>TR-FRET</b>	Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer
<b>TrkB</b>	tropomyosin receptor kinase B
<b>UBE2D3</b>	UBiquitin-conjugating Enzyme E2 D3
<b>UPS</b>	Ubiquitin Proteasome System
<b>UsnRNP</b>	spliceosomal Uridine-rich small nuclear Ribonucleoprotein
<b>UTR</b>	UnTranslated Region
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>WB</b>	Western Blot
<b>YAC</b>	Yeast Artificial Chromosome
<b>ZFP</b>	Zinc Finger Protein

## Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Rôle des répétitions CAG dans la physiopathologie de la maladie de Huntington. ....	23
Figure 2 : Coupe sagittale d'un cerveau de singe montrant la localisation des composants majeurs des ganglions de la base.....	26
Figure 3 : Schéma représentant les voies « directes » et « indirectes ». ....	27
Figure 4 : Sections coronales de cerveaux provenant de différentes personnes. ....	28
Figure 5 : Schéma représentant le gène <i>IT15</i> ou <i>HTT</i> codant pour la huntingtine. ....	29
Figure 6 : Schéma représentant la protéine huntingtine. ....	31
Figure 7 : Schéma représentant les mécanismes cellulaires pathologiques dans la MH. ....	35
Figure 8 : Schéma des différentes stratégies de modifications génétiques utilisées pour générer des modèles animaux pour la MH. ....	41
Figure 9 : Schéma représentant les différentes cibles thérapeutiques étudiées pour la MH.....	46
Figure 10 : Avantages et inconvénients des trois grands types de vecteurs viraux utilisés en thérapie génique. ....	55
Figure 11 : Représentation d'une approche CRISPR-Cas9 permettant une délétion spécifique du gène muté. ....	61
Figure 12 : Schéma du mécanisme d'ARN interférence et des outils nécessaires pour induire la diminution de l'expression d'un gène. ....	62
Figure 13 : Représentation de la structure secondaire des transcrits <i>HTT</i> sauvage (17 répétitions CAG) et muté (41CAG). ....	65
Figure 14 : Structures chimiques des différents ASO. ....	67
Figure 15 : Mécanismes d'action des ASO pour moduler l'expression d'un gène. ....	69
Figure 16 : Les approches de <i>silencing</i> dans la MH. ....	71
Figure 17 : Représentation des exons contenant les sites de clivage et du saut partiel de l'exon 12 obtenu avec le 2'OMe 12.1. ....	76
Figure 18 : Structure d'un U7snRNP. ....	78
Figure 19 : Schéma représentant les différentes stratégies antisens testées dans ce projet de recherche.....	85
Figure 20 : Analyse de dessin des séquences antisens permettant de sauter les exons 12 et 13 afin d'enlever les sites de clivage. ....	91
Figure 21 : Efficacité de saut d'exon des ASO ciblant les exons 12 et 13 après transfection de fibroblastes sauvages GM02171 (17/17 CAG). ....	93
Figure 22 : Schéma représentant les différents sauts d'exons possibles. ....	94
Figure 23 : Efficacité de saut d'exon des ASO ciblant les exons 12 et 13 après co-transfection de fibroblastes sauvages GM02171 (17/17 CAG). ....	94
Figure 24 : Dessin des séquences antisens permettant de sauter les exons 12 et 13 afin d'enlever les sites de clivage.....	96
Figure 25 : Représentation schématique des différentes constructions U7 réalisées. ....	97
Figure 26 : Efficacité des lentivirus-U7-snRNA ciblant les exons 12 et 13 après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG). ....	99
Figure 27 : Evaluation du niveau d'ARNm <i>HTT</i> entre les exons 7 et 8 par qPCR après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) des lentivirus-U7-snRNA ciblant les exons 12 et 13. ....	100
Figure 28 : Evaluation du niveau protéique de la huntingtine après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) par des lentivirus-U7-snRNA ciblant les exons 12 et 13. ....	100

Figure 29 : Effet des ASO ciblant les répétitions CAG sur l'ARNm <i>HTT</i> .....	102
Figure 30 : Evaluation du niveau d'ARNm <i>HTT</i> par PCR quantitative après transfection des oligonucléotides antisens ciblant les répétitions CAG.....	103
Figure 31 : Evaluation du niveau protéique de <i>HTT</i> après transfection de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) des oligonucléotides antisens ciblant les répétitions CAG.....	104
Figure 32 : Evaluation des lentivirus-U7-siRNA ciblant les répétitions CAG de l'ARNm <i>HTT</i> .....	105
Figure 33 : Evaluation du niveau protéique de <i>HTT</i> après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) avec des LV-U7 ciblant les répétitions CAG.....	106
Figure 34 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm <i>HTT</i> , après transfection de fibroblastes GM03621 (59/18 CAG).....	107
Figure 35 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau total d'ARNm <i>HTT</i> , après transfection dans les différentes lignées de fibroblastes.....	108
Figure 36 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau de protéine <i>HTT</i> , après transfection de GM09197 (151/21CAG).....	109
Figure 37 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau de <i>HTT</i> , après transfection de GM09197 (151/21CAG).....	110
Figure 38 : Quantification des biomarqueurs par qPCR dans les différents types cellulaires. ....	111
Figure 39 : Quantification des biomarqueurs dans différents échantillons de la lignée contrôle GM02171 (17/17 CAG).....	112
Figure 40 : Gels d'agarose de RT-PCR permettant d'amplifier l'exon 1 avec les répétitions CAG.....	113
Figure 41 : Effet des ASO synthétiques sur le niveau total d'ARNm <i>HTT</i> dans le cortex, hippocampe, striatum et cervelet après injection de différentes doses de Tc CTG dans le ventricule latéral droit de souris YAC128.....	114
Figure 42 : Evaluation du niveau de <i>HTT</i> dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et le cervelet après injection de différentes doses de Tc CTG dans le ventricule latéral droit de souris YAC128. ....	115
Figure 43 : Effet des AAV-U7siRNA ciblant les répétitions CAG après injection ICV chez la souris YAC128 sur le niveau d'ARNm <i>HTT</i> . ....	116
Figure 44 : Effet des AAV-U7 ciblant les répétitions CAG sur le niveau de <i>HTT</i> après injection ICV de souris YAC128.....	117
Figure 45 : Effet des ASO <i>gapmer</i> après injection ICV chez la souris YAC128 sur le niveau d'ARNm <i>HTT</i> . ....	118
Figure 46 : Effet des TcNS sur le niveau de <i>HTT</i> 2 semaines après injection ICV de souris YAC128. ....	119
Figure 47 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm <i>HTT</i> 6 semaines après injection ICV chez la souris YAC128. ....	120
Figure 48 : Effet des TcNS sur le niveau de <i>HTT</i> 6 semaines après injection ICV de souris YAC128. ....	121
Figure 49 : Effet des <i>gapmer</i> ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm <i>HTT</i> 12 semaines après injection ICV chez la souris YAC128. ....	122
Figure 50 : Effet des TcNS sur le niveau de <i>HTT</i> 12 semaines après injection ICV de souris YAC128. ....	123
Figure 51 : Durée du <i>silencing</i> induit par TcNS. ....	124
Tableau I : Avantages et inconvénients des cellules fœtales humaines et des cellules souches pluripotentes pour la thérapie cellulaire de la MH.....	53
Tableau II : Propriétés des sérotypes principaux d'AAV dans le SNC.....	57
Tableau III : Séquences antisens des ASO ciblant les exons 12 et 13. ....	92
Tableau IV : Séquences antisens ciblant les exons 12 et 13. ....	95







# Introduction

I.	La maladie de Huntington.....	22
A.	Historique.....	22
B.	Epidémiologie.....	24
C.	Symptômes.....	24
D.	Physiopathologie.....	26
E.	Modèles animaux.....	40
II.	Traitements et essais thérapeutiques en cours.....	45
A.	Agents pharmacologiques.....	45
B.	Thérapie cellulaire.....	52
C.	Thérapie génique.....	55
D.	Le mécanisme d'ARN interférence.....	61
E.	Les oligonucléotides antisens.....	65
III.	Les stratégies antisens comme outil thérapeutique.....	66
A.	Les oligonucléotides antisens.....	66
B.	Un système vectorisé : le U7snRNA.....	77



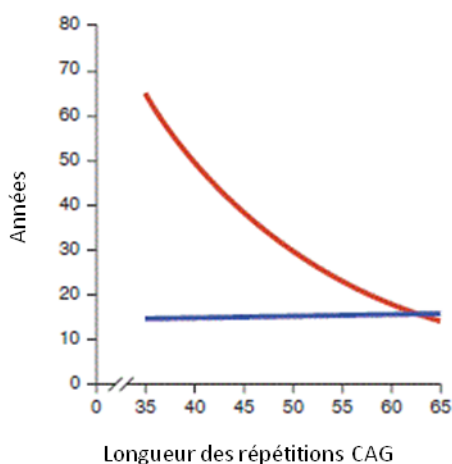
## I. La maladie de Huntington

### A. Historique

George Huntington, jeune médecin américain, signala pour la première fois en 1872 des cas de « chorée » en référence aux mouvements incontrôlés des patients ressemblant à une danse (Huntington, 2003). Il remarqua également que cette pathologie était restreinte à certaines familles, c'est pourquoi il la nomma « chorée héréditaire ». Il décrivit avec une grande précision le comportement de ses patients qui souffraient de manière graduelle jusqu'à ce que l'ensemble des muscles volontaires soit soumis à des spasmes violents. L'apparition des symptômes était tardive, autour de 30 à 40 ans et aucun traitement ne pouvait apporter une quelconque amélioration. Le Dr. Huntington souligna également l'état psychologique de ses patients qui présentaient un état de démence pouvant les pousser jusqu'au suicide. Bien qu'il fut le premier à décrire de manière très précise cette pathologie, ce qui lui valut d'en être le docteur éponyme, d'autres personnes souffrant de troubles similaires avaient été, environ deux siècles avant, répertoriées (Bhattacharyya, 2016). La maladie n'étant pas connue à cette époque, elles furent jugées comme possédées par le diable et brûlées sur la place publique à cause de leur comportement étrange et de leurs mouvements anormaux.

C'est seulement en 1993 que le gène responsable de la maladie de Huntington (MH) fut isolé sur le chromosome 4 par une collaboration de 58 chercheurs (MacDonald *et al.*, 1993). Les équipes observèrent ainsi pour la première fois l'expansion de codons CAG dans le gène *IT15* (Interesting Transcript 15) codant pour une protéine de 350kDa baptisée huntingtine (HTT). Elles remarquèrent alors que les personnes possédant plus de 41 répétitions CAG sur un des deux allèles contractent cette pathologie avec une pénétrance complète (MacDonald *et al.*, 1993). A l'inverse, celles présentant un nombre de répétitions CAG inférieur à 35 n'ont pas de risque de développer la MH (Rubinsztein *et al.*, 1996). Entre 36 et 40 CAG, la pénétrance est réduite et d'autres facteurs environnementaux et génétiques entrent en considération (McNeil *et al.*, 1997). De manière intéressante, il existe une forte corrélation entre le nombre de répétitions CAG et l'âge d'apparition de la maladie (Duyao *et al.*, 1993; Stine *et al.*, 1993). En effet, plus ce nombre est grand, plus la pathologie se déclare tôt comme on peut le voir sur la **figure 1**. En revanche, le nombre de CAG n'a pas d'impact sur la durée de

la MH, qui s'étale en moyenne sur 15 ans depuis l'apparition des premiers symptômes jusqu'au décès du patient (Finkbeiner, 2011).



**Figure 1 : Rôle des répétitions CAG dans la physiopathologie de la maladie de Huntington.**

Courbe rouge : Corrélation entre le nombre de répétitions CAG et l'âge d'apparition de la maladie. Courbe bleu : Corrélation entre le nombre de répétitions CAG et la durée de la maladie, de l'apparition jusqu'au décès du patient, (adaptée de Finkbeiner, 2011).

De plus, les chercheurs remarquent qu'à partir de 28 répétitions CAG, une instabilité génétique lors de la réplication de l'ADN conduit à une augmentation de ce nombre de trinuécléotides (Ranen *et al.*, 1995; Trottier *et al.*, 1994). Ce phénomène survient à une fréquence plus élevée lors de la spermatogenèse que lors de l'oogenèse, ce qui explique que cette pathologie soit principalement transmise par le père. Cela justifie également l'apparition de nouveaux cas de MH dans une famille sans antécédent, mais dans laquelle on retrouve, le plus souvent du côté paternel, un allèle portant un nombre de répétitions CAG à la limite du seuil pathologique (entre 28 et 35). Cette instabilité génétique permet de comprendre l'augmentation de ce nombre de trinuécléotides de génération en génération, entraînant l'apparition d'une forme précoce de la pathologie : la maladie de Huntington juvénile (MHJ) (Telenius *et al.*, 1993). Contrairement à ce que pensait initialement le Dr. Georges Huntington, la MH peut également toucher les enfants (Milunsky *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2011; Telenius *et al.*, 1993). La MHJ est caractérisée par une apparition des symptômes avant l'âge de 20 ans et un nombre de répétitions CAG pouvant varier de 60 à 250.

Depuis la découverte du gène *IT15* (renommé ensuite *HTT*) en 1993, il est désormais possible de réaliser un test génétique permettant de connaître le nombre de répétitions CAG

(Nopoulos, 2016). La MH étant une maladie autosomique dominante, lorsqu'un parent est atteint de la MH, l'enfant à 50% de risque d'hériter de la maladie. Cependant, seules 5 à 10% des personnes à risque choisissent de faire ce test qui doit être encadré par des généticiens, des neurologues et également des psychologues.

## B. Epidémiologie

La MH touche autant les hommes que les femmes et est retrouvée dans toutes les populations avec cependant une fréquence beaucoup plus faible dans les pays asiatiques (Pringsheim *et al.*, 2012). En effet, la prévalence en Asie est de 0,4 pour 100 000 contre 5 à 6 pour 100 000 pour les peuples d'origine caucasienne. Cette diversité entre ethnies s'explique par des différences génétiques au niveau du locus *HTT* (Kay *et al.*, 2014a). Par exemple, la majorité des asiatiques portent environ 17,6 répétitions CAG alors que les descendants européens en présentent une de plus en moyenne. Cela semble indiquer qu'une population possédant une expansion de CAG plus grande augmente le risque de mutation pouvant conduire à la MH. De la même façon, les personnes d'origine africaine possèdent entre 16,9 et 17,4 CAG, ce qui corrèle avec une prévalence très faible de la MH sur ce continent.

## C. Symptômes

La MH est une pathologie complexe, qui se traduit par des troubles moteurs, cognitifs et comportementaux. Il est important de noter que les symptômes peuvent varier d'un patient à un autre, même au sein d'une même famille.

### 1. Troubles moteurs

Il existe deux grandes catégories de troubles moteurs dont les patients sont atteints : une augmentation des mouvements involontaires, comme la chorée, et une diminution des mouvements volontaires, comme un manque de coordination des membres (Novak et Tabrizi, 2011). En général, les premiers symptômes perçus par le patient ou son entourage sont les mouvements choréiques. Au fur et à mesure que la maladie progresse, ces mouvements involontaires ont tendance à diminuer pour laisser place à une dystonie, c'est-à-dire une contraction musculaire intense et involontaire, ainsi qu'à une rigidité musculaire et une bradykinésie (ralentissement des mouvements volontaires). Cette évolution doit bien évidemment être prise en considération pour adapter le traitement, comme nous le verrons

par la suite. Certains patients souffrent aussi de tics et d'acathésie, ce qui désigne l'incapacité à rester assis.

## 2. Troubles cognitifs

Les patients atteints de la MH présentent aussi des démences sous-corticales, à un degré variable d'un individu à un autre (Sellal, 1996). Ces troubles cognitifs se caractérisent par des pertes de mémoire, une lenteur intellectuelle et des difficultés à se concentrer, à réaliser plusieurs tâches simultanément, à planifier et à organiser leurs activités (Lawrence *et al.*, 1996). La perception spatio-temporelle des malades est également altérée, conduisant à des erreurs d'appréciation de l'environnement et notamment des émotions de leur entourage (Sprengelmeyer *et al.*, 1996).

## 3. Troubles comportementaux

En plus des symptômes moteurs et cognitifs, les patients souffrent très souvent de dépression accompagnée parfois de pensées suicidaires (Novak et Tabrizi, 2011). En effet, ils sont souvent plus anxieux, irritables et apathiques. Leur comportement et leur personnalité changent et cela s'aggrave généralement au cours de la pathologie. Ces problèmes comportementaux et psychiatriques sont souvent les plus difficiles à supporter pour les patients et leur entourage, déclenchant la nécessité d'une hospitalisation (van Duijn *et al.*, 2007).

## 4. Autres symptômes

Les patients atteints de la MH souffrent d'autres problèmes périphériques. Ils subissent par exemple une importante perte de poids, une atrophie des muscles squelettiques et des testicules et présentent divers problèmes cardiaques et de l'ostéoporose. L'origine de ces symptômes n'est pas encore bien déterminée. En effet, ces derniers découleraient soit directement de la neurodégénérescence, soit de l'action de la protéine mutée dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques notamment (van der Burg *et al.*, 2009). Ces deux hypothèses seront étudiées plus précisément dans les **parties D.3.** et **4.** qui traitent des fonctions de la huntingtine sauvage et mutée. Le sommeil est lui aussi impacté, principalement à cause de l'anxiété et des mouvements incontrôlés (Novak et Tabrizi, 2011). Les patients ont également des difficultés à communiquer et à déglutir ce qui leur pose des problèmes pour s'alimenter. Le décès survient généralement à cause d'une défaillance

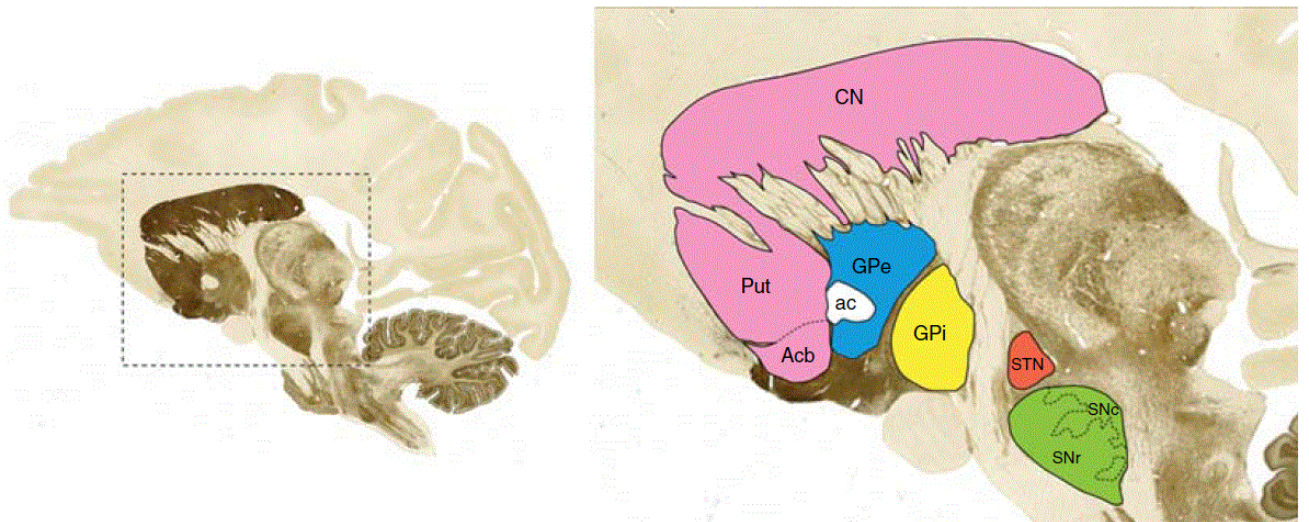
cardiaque ou d'une pneumonie par aspiration, une affection caractérisée par un reflux gastrique dans les bronches (Gil et Rego, 2008).

## D. Physiopathologie

### 1. Neuropathologie

La MH se caractérise principalement par une dégénérescence du striatum, une structure nerveuse sous-corticale composée du noyau caudé et du putamen, et du striatum ventral (Lanciego *et al.*, 2012). Le striatum fait partie des ganglions de la base (GB), également appelés noyaux gris centraux. L'organisation des GB, illustrée **figure 2**, regroupe :

- Le striatum dorsal (Noyau Caudé (CN) et Putamen (Put))
- Le striatum ventral (noyau Accumbens (Acb) et tubercules olfactifs)
- Le pallidum (Globus Pallidus interne et externe (GPi et GPe))
- La Substance Noire *pars compacta* (SNc) et *pars reticula* (SNr)
- Le Noyau Sous-Thalamique (STN)

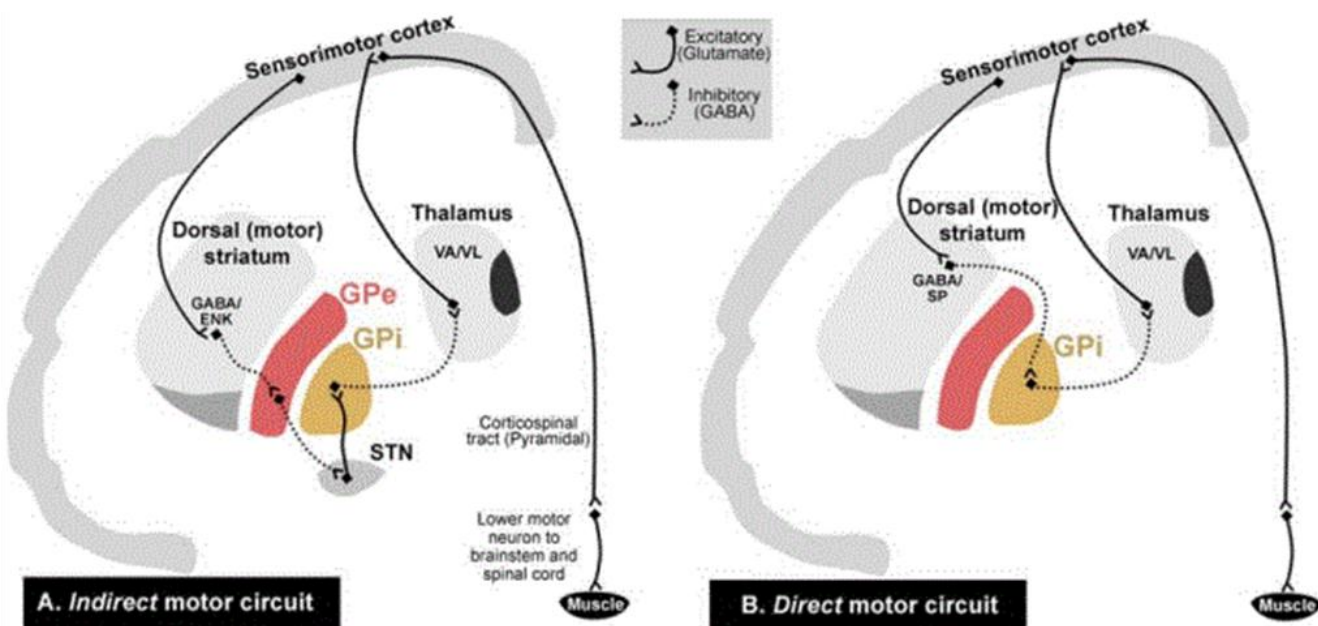


**Figure 2 : Coupe sagittale d'un cerveau de singe montrant la localisation des composants majeurs des ganglions de la base.**

CN : Noyau Caudé ; Put : Putamen ; Acb : noyau Accumbens ; GPe : Globus Pallidus externe ; GPi : Globus Pallidus interne ; STN : Noyau Sous-Thalamique ; SNc : Substance Noire *pars compacta* ; SNr : Substance Noire *pars reticula*, (Lanciego *et al.*, 2012).



Les GB sont cruciaux pour réaliser les tâches motrices, pour initier les mouvements, mais également pour l'apprentissage, la mémoire, le comportement et les émotions. En effet, ils sont impliqués dans des boucles fonctionnelles très importantes, notamment les circuits moteurs « directs » et « indirects ». Comme on le voit sur la **figure 3**, la voie directe va activer le striatum qui va inhiber fortement le GPi. Cela va donc induire une diminution de l'inhibition du thalamus, et donc une augmentation de la stimulation des neurones thalamo-corticaux. Ainsi, l'activation de la voie directe induit un mécanisme de rétrocontrôle positif, alors qu'à l'inverse, l'activation de la voie indirecte entraîne, *via* un mécanisme plus complexe, une boucle de rétrocontrôle négative. La compréhension de ces circuits permet donc d'appréhender les problèmes moteurs rencontrés chez les patients atteints de la MH. En effet, ces patients souffrent d'une dégénérescence du striatum, et plus particulièrement des neurones épineux moyen (MSN pour Medium Spiny Neurons) qui représentent 90 à 95% de la population neuronale du striatum (Singh-Bains *et al.*, 2016). La mort de ces neurones GABAergiques, donc inhibiteurs, entraîne une activation aberrante des GB, induisant donc des mouvements incontrôlés.



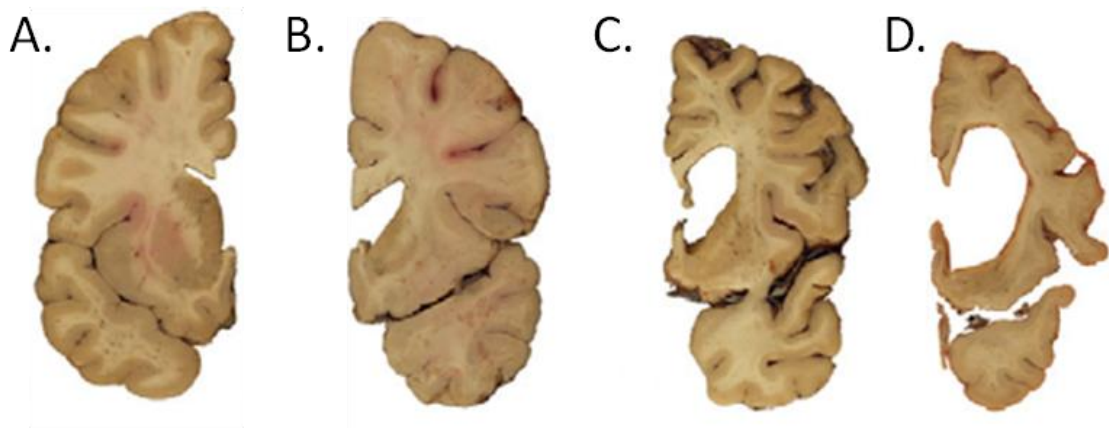
**Figure 3 : Schéma représentant les voies « directes » et « indirectes ».**

GPe : Globus Pallidus externe ; GPi : Globus Pallidus interne ; STN : Noyau Sous-Thalamique ; (Singh-Bains *et al.*, 2016).

D'autre part, en plus de la dégénérescence des neurones du striatum et du cortex, on observe également une activation de la microglie, qui reflète la neuroinflammation présente dans les cerveaux de patients MH (Sapp *et al.*, 2001 ; Vonsattel *et al.*, 1985).

Depuis le début du XXème siècle où Anton avait fait le lien entre l'atrophie du striatum et les mouvements choréiques (Margaret M. Esiri et James H. Morris, 1997), un grand nombre d'équipe s'est attelé à connaître l'étendue des dommages afin de comprendre cette pathologie. De nombreuses études se contredisent et certaines rapportent également une atteinte de l'hypothalamus, de l'hippocampe, de l'amygdale, de la substance noire voire même du cervelet (Rüb *et al.*, 2016 ; Vonsattel *et al.*, 2012). Ces divergences s'expliquent par le fait que, tout comme les symptômes varient d'un individu à l'autre, les zones impactées diffèrent d'un cerveau à l'autre. Cela dépend du stade d'avancement de la maladie au moment de la mort du patient, de l'âge d'apparition des premiers symptômes et de la survenue du décès, du nombre de répétitions CAG et probablement d'autres facteurs encore méconnus.

En 1985, Vonsattel *et al.* a établi une échelle de sévérité de la pathologie divisée en 5 grades (de 0 à 4) en se basant sur des examens microscopiques et macroscopiques de cerveaux de personnes atteintes de la MH (Vonsattel *et al.*, 1985). Le stade 0 ne montre aucune anomalie microscopique bien que la MH ait été diagnostiquée, alors que le stade 4 signifie que 95% des neurones du noyau caudé ont été perdus. Comme le montre la **figure 4**, le processus de neurodégénérescence affecte initialement le striatum et le cortex, jusqu'à endommager l'ensemble du cerveau.



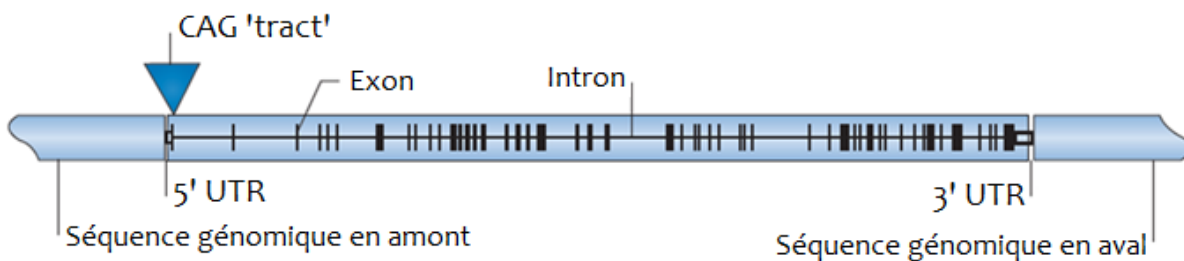
**Figure 4 : Sections coronales de cerveaux provenant de différentes personnes.**

**A.** Homme sain de 43 ans, poids du cerveau (PC) : 1412,4g. **B.** Homme de 24 ans qui a développé la maladie à 13 ans, avec 70 et 20 répétitions CAG, PC : 1167,9g, stade 3. **C.** Homme de 53 ans qui a développé la MH à 36 ans, avec 46 et 17 CAG, PC : 1141,6g stade 3. **D.** Homme de 56 ans, avec 49 et 22 CAG, qui a développé la MH depuis plus de 40 ans, PC : 832,1g, stade 4, (adaptée de Vonsattel *et al.*, 2012).

Les ventricules latéraux sont également élargis, et tout cela se répercute sur le poids global du cerveau, qui doit être aux alentours de 1350g pour un individu sain et qui est très largement diminué chez les patients en stade final (Vonsattel *et al.*, 2012).

## 2. Le gène *HTT*

Comme précédemment décrit dans l'introduction, le gène responsable de la MH, préalablement nommé *IT15* et rebaptisé *HTT* pour la protéine qu'il code, est localisé sur le chromosome 4. Il couvre 180 kb et est composé de 67 exons, dont le premier contient les répétitions CAG (Ambrose *et al.*, 1994), comme schématisé dans la **figure 5**.



**Figure 5 : Schéma représentant le gène *IT15* ou *HTT* codant pour la huntingtine.**

Les rectangles verticaux correspondent à des exons alors que les traits symbolisent des introns. L'expansion de CAG, ou « CAG tract », se situe dans l'exon 1. Les séquences génomiques en amont et en aval sont également schématisées avec les régions 5' et 3' UTR (untranslated region), (adaptée de Pouladi *et al.*, 2013).

Deux transcrits majoritaires sont retrouvés : un large transcrit de 13,7 kb prédominant dans le cerveau, et un transcrit plus court de 10,3 kb retrouvé dans les autres tissus comme le cœur, les muscles, le foie et les poumons. Ces deux transcrits majoritaires ne varient que par leur région 3'UTR (Ambrose *et al.*, 1994 ; Lin *et al.*, 1993) et donnent donc naissance à une même protéine de 348 kDa (MacDonald *et al.*, 1993), la huntingtine, dont la fonction exacte reste encore méconnue. Le triplet CAG code pour la glutamine, ainsi la forme mutée de HTT (muHTT) contient une expansion de polyglutamine.

La MH fait donc partie des maladies par expansion de polyglutamine, parmi lesquelles sont retrouvées également l'amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X, l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne, et certaines ataxies spinocérébelleuses (Shao et Diamond, 2007).

Récemment, 22 transcrits *HTT* différents ont été identifiés dans le cerveau humain (Mort *et al.*, 2015). Bien qu'ils ne conservent pas tous le cadre de lecture, ces ARNm peuvent jouer un rôle notamment dans la régulation du gène *HTT*. Il est donc important de continuer à

investiguer pour connaître le répertoire entier de transcrits et d'isoformes *HTT* afin d'élucider un jour toutes les fonctions de la huntingtine.

### 3. Fonctions de la huntingtine physiologique

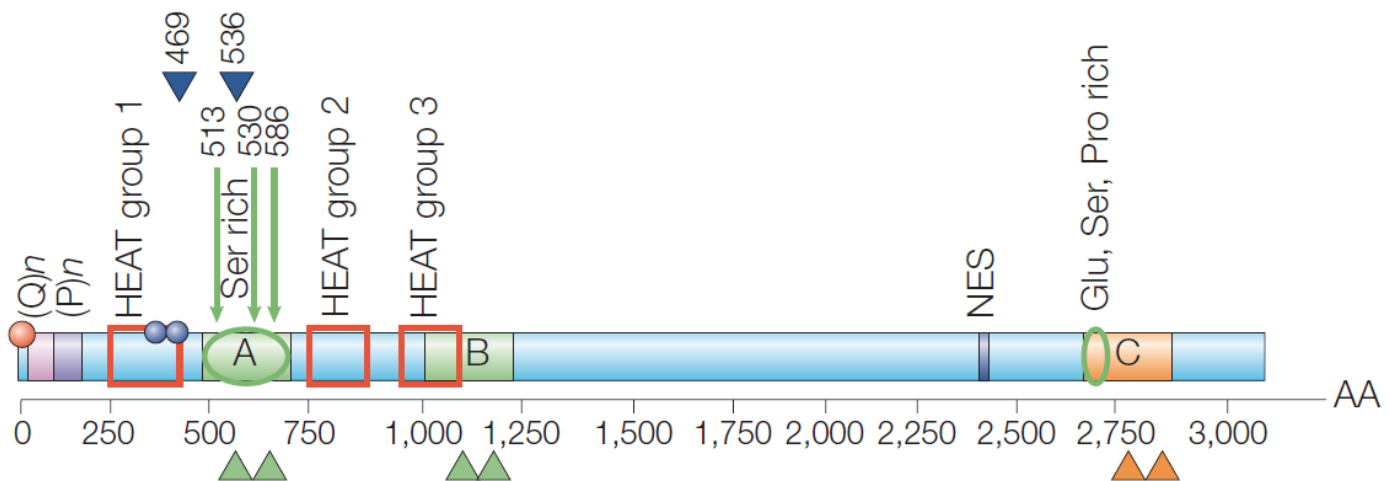
#### a. La huntingtine à travers l'évolution

Différentes comparaisons réalisées entre le gène *HTT* humain et celui d'autres vertébrés montrent un fort degré de conservation. Une étude s'est notamment intéressée au poisson *Fugu rubripes*, le vertébré possédant le plus petit génome (Baxendale *et al.*, 1995). Elle montre que, malgré un locus homologue au gène *HTT* humain couvrant seulement 23 kb chez ce poisson, les 67 exons sont tout de même retrouvés. D'autre part, il est intéressant de noter que le début de l'exon 1, qui contient les répétitions CAG, est particulièrement conservé entre les espèces. En effet, les 17 premiers acides aminés (AA) sont strictement identiques entre le *Fugu*, la souris et l'homme. Cependant, le nombre de glutamines diffère entre ces 3 espèces : on en retrouve respectivement 4, 7 et au minimum 6 chez l'homme (Barnes *et al.*, 1994 ; Baxendale *et al.*, 1995). L'homologue murin, nommé *Hdh* et localisé au niveau du chromosome 5, est particulièrement proche de la séquence humaine puisqu'il présente une similitude de 86% au niveau nucléotidique et de 91% au niveau protéique (Barnes *et al.*, 1994). Ce grand degré de conservation parmi les vertébrés et particulièrement parmi les mammifères indique un rôle important de la huntingtine.

#### b. La structure de la huntingtine

On ne retrouve malheureusement pas d'homologie significative entre la huntingtine et d'autres protéines connues permettant d'en apprendre davantage sur sa fonction. L'extrémité N-terminale de la protéine a été particulièrement étudiée puisqu'elle contient l'expansion de polyglutamine ((Q)<sub>n</sub>), qui se situe après 17 AA et avant un domaine riche en proline (PRD) (Cattaneo *et al.*, 2005), comme schématisé sur la **figure 6**. Ces 17 AA forment une structure en hélice, ce qui est particulièrement important pour la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Atwal *et al.*, 2007 ; Rockabrand *et al.*, 2006). La partie C-terminale contient pour sa part un signal d'export nucléaire (NES) (Xia *et al.*, 2003). Enfin, la huntingtine est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui affectent sa clairance ainsi que sa localisation cellulaire (Maiuri *et al.*, 2013 ; Steffan, 2004 ; Thompson *et al.*, 2009).

Des répétitions en tandem d'environ 40 nucléotides ont été retrouvées dans différentes protéines, dont HTT, et ont été nommées HEAT pour le nom des 4 protéines possédant ce motif : la huntingtine (H), le facteur d'élongation 3 (E), la protéine phosphatase 2A (A) et la kinase TOR1 (T) (Andrade et Bork, 1995). Ces répétitions sont composées de deux hélices  $\alpha$  antiparallèles et sont impliquées dans les interactions protéiques. Etant donné que la huntingtine est composée majoritairement de domaines HEAT, sa structure générale est en superhélice (Li *et al.*, 2006).



**Figure 6 : Schéma représentant la protéine huntingtine.**

Les régions (Q)n et (P)n symbolisent respectivement la queue polyglutamine et polyproline. Les rectangles rouges correspondent aux trois principaux domaines HEAT. Les sphères indiquent les modifications post-traductionnelles : celle en orange représentent le site d'ubiquitination et/ou de sumoylation, et celle en bleu les sites de phosphorylation. Les sites de clivage sont symbolisés par des flèches vertes. Les régions riches en sérine, glutamine et proline sont identifiées par des cercles verts. AA : Acide Aminé ; NES : Nuclear Export Signal, (Cattaneo *et al.*, 2005).

### c. Les interactions de la huntingtine

Afin de comprendre les fonctions de la huntingtine, les recherches se sont rapidement concentrées sur l'identification de ses interactions avec d'autres facteurs ou protéines. Plus de 350 partenaires ont ainsi été identifiés : ils se lient en particulier aux répétitions HEAT et au PRD de HTT (Harjes et Wanker, 2003). L'extrémité C-terminale joue également un rôle puisqu'elle semblerait notamment interagir avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B p50, évoquant un potentiel rôle de HTT comme régulateur de certains gènes (Takano et Gusella, 2002). La huntingtine se lie également à des protéines du cytosquelette comme la dynactine et la kinésine *via* son interaction avec HAP-1 (Huntingtin-associated protein 1) (Engelender *et al.*, 1997 ; McGuire *et al.*, 2006). L'ensemble des protéines interagissant avec HTT est

impliqué dans différents processus biologiques tels que le trafic cellulaire, l'endocytose, l'adhésion cellulaire, le métabolisme, la régulation de l'expression de gènes, laissant supposer un très vaste rôle de HTT au niveau cellulaire (Saudou et Humbert, 2016).

#### d. La localisation de la huntingtine

La huntingtine est ubiquitaire, malgré une expression plus importante dans le système nerveux central et les testicules (Li *et al.*, 1993 ; Sharp *et al.*, 1995). Au sein du cerveau, elle est retrouvée dans différentes zones sans être particulièrement enrichie dans le noyau caudé et le putamen, où la neuro-dégénérescence est pourtant la plus marquée dans la MH (Hoozeveen *et al.*, 1993 ; Sharp *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995). Ainsi, le profil d'expression de HTT ne corrèle pas avec la physiopathologie observée dans la maladie, puisqu'elle est présente dans tout l'organisme et non pas seulement dans le striatum (Li *et al.*, 1993 ; Sharp *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995). Au sein de la cellule, la huntingtine est retrouvée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, et elle est associée à différents organelles, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les microtubules mais aussi à des structures vésiculaires dans les neurites et les synapses (DiFiglia *et al.*, 1995 ; Hoffner *et al.*, 2002 ; Kegel *et al.*, 2002 ; Velier *et al.*, 1998). Sa localisation intracellulaire est donc très diffuse, ce qui ne facilite pas la compréhension de sa fonction.

#### e. La huntingtine sous toutes ces formes

Comme mentionné précédemment, HTT est codée par deux transcrits conduisant à l'expression d'une même protéine de 348 kDa. L'épissage alternatif évoqué préalablement pourrait conduire à différentes isoformes qui n'ont pas encore été clairement identifiées, mais qui pourraient différer de la protéine de 348 kDa par leur taille et leur(s) fonction(s) (Hughes *et al.*, 2014 ; Mort *et al.*, 2015 ; Ruzo *et al.*, 2015). Cependant, la littérature décrit beaucoup plus précisément les clivages subis par la huntingtine. En effet, cette dernière contient différents sites de coupure, notamment par des caspases et des calpaïnes (Gafni *et al.*, 2004 ; Goldberg *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2001; Wellington *et al.*, 2000). Là encore, les conséquences physiologiques de la protéolyse de la huntingtine ne sont pas encore bien comprises. Nous reviendrons sur ce point dans les parties traitant de la huntingtine mutée et des stratégies thérapeutiques.

f. Et si on diminue le niveau d'expression de la huntingtine ?

Afin de comprendre le rôle de la huntingtine physiologique, des chercheurs américains ont inactivé chez une souris l'homologue murin du gène *HTT* (*Hdh*). Ainsi, il a été montré que les souris *knock-out* (KO) homozygotes, sans aucune expression de la huntingtine, subissent des dommages sévères et meurent à l'état embryonnaire entre le 8<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de gestation (Duyao *et al.*, 1995 ; Zeitlin *et al.*, 1995). La huntingtine est donc fondamentale pour le développement embryonnaire. Les souris hétérozygotes, en revanche, ont un phénotype normal, indissociable des souris sauvages, ce qui laisse penser qu'un allèle *HTT* est suffisant pour jouer son rôle dans le développement (Auerbach *et al.*, 2001). Cependant, ces souris qui possèdent un faible niveau de huntingtine sauvage présentent tout de même un développement anormal du cerveau avec notamment un élargissement des ventricules, bien qu'elles ne présentent pas de troubles moteurs. De plus, l'inactivation conditionnée de *Hdh* dans le cerveau et dans les testicules de souris 5 jours après leur naissance induit une neurodégénérescence progressive et une stérilité (Dragatsis *et al.*, 2000). D'autre part, des études réalisées sur différentes lignées de cellules souches embryonnaires (ESC) KO pour le gène *HTT* montrent qu'elles sont capables de se différencier en neurones et d'établir des synapses fonctionnelles sans huntingtine (Metzler *et al.*, 1999). Cependant, ces cellules présentent un nombre de progéniteurs hématopoïétiques plus faible, suggérant que la huntingtine est nécessaire pour l'expansion des cellules sanguines (Metzler *et al.*, 2000). Il a également été démontré qu'une déficience en huntingtine entraîne une distribution ainsi qu'une morphologie anormale de différentes organelles comme les endosomes, l'appareil de Golgi, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Hilditch-Maguire *et al.*, 2000). Enfin, des études menées chez la drosophile et la souris montrent qu'une absence de huntingtine chez ces deux espèces induit une réduction du transport vésiculaire axonal ainsi qu'une immobilisation progressive des mitochondries (Gunawardena *et al.*, 2003; Trushina *et al.*, 2004).

De manière très intéressante, une étude récente montre à l'aide d'un modèle de souris KO inductible que la diminution de la huntingtine chez les souris adultes est plutôt bien tolérée (Wang *et al.*, 2016). En effet, 95% des souris déplétées en *HTT* à l'âge de 2 mois meurent dix jours après, alors que le taux de mortalité chute lorsque le KO est réalisé à 4 et 8 mois (respectivement 30 et 5% de souris mortes).

L'ensemble de ces études suggèrent l'importance de la huntingtine à travers son effet neuro-protecteur. Il est également important de garder en mémoire que la fonction de HTT est dépendante de l'âge et du type cellulaire.

g. Et si on augmente l'expression de la huntingtine ?

L'effet neuroprotecteur et anti-apoptotique de HTT est aussi observée dans des cellules striatales où la surexpression de HTT les protège d'une mort cellulaire induite par des stimuli nocifs. La huntingtine interfère, en effet, avec l'activité du complexe de l'apoptosome (Rigamonti *et al.*, 2000, 2001) ce qui a également été confirmé par des analyses *in vivo* (Leavitt *et al.*, 2001, 2006; Zhang *et al.*, 2003). De plus, HTT induit l'expression d'un facteur neurotrophique, le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), qui est synthétisé par les cellules corticales et est nécessaire à la survie des neurones striataux (Zuccato, 2001). Plus particulièrement, il a été démontré que la huntingtine sauvage séquestre dans le cytoplasme REST/NRSF (repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor), un facteur de transcription qui se lie à NRSE, responsable lui-même de la répression de la synthèse de BDNF (Zuccato *et al.*, 2003). Ainsi, HTT inhibe l'activité de NRSE, ce qui entraîne une augmentation de la transcription de BDNF.

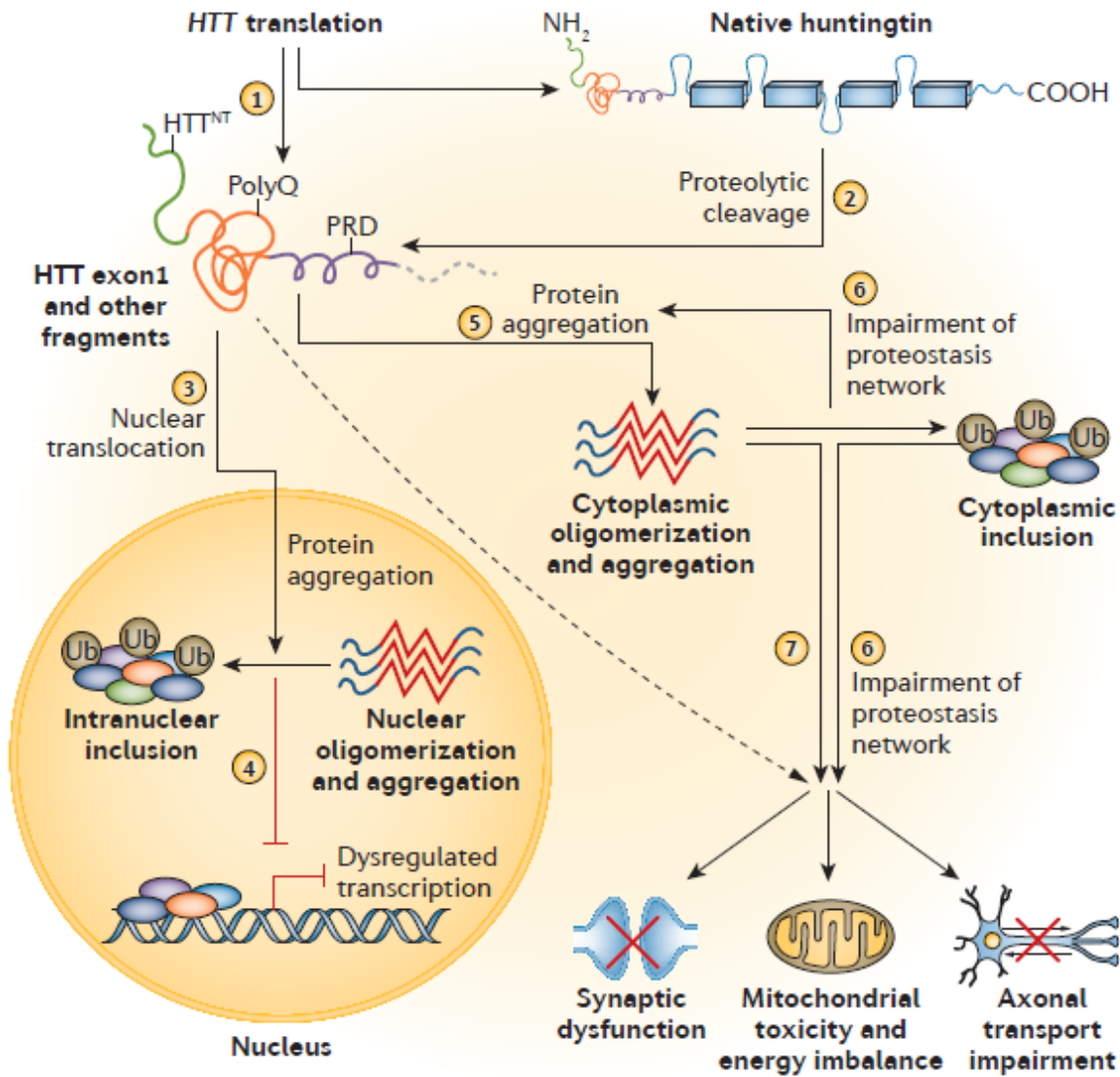
En conclusion, la huntingtine joue un rôle très important dans le développement embryonnaire, l'hématopoïèse et la neurogenèse. Au niveau cellulaire, cette protéine anti-apoptotique est très importante pour : le trafic vésiculaire, notamment par sa liaison à la dynéine et à la kinésine (deux protéines motrices), la division cellulaire, et également la régulation de la transcription.

4. Propriétés de la huntingtine mutée

a. Quels sont les mécanismes cellulaires impactés ?

Si les fonctions de la huntingtine sauvage restent encore obscures, il en est de même concernant les propriétés de la huntingtine mutée. L'expansion de polyglutamine modifie les propriétés de la huntingtine, notamment par un mauvais repliement et entraîne la formation d'agrégats, un défaut de clairance, une dérégulation transcriptionnelle et une dysfonction mitochondriale, comme schématisé sur la **figure 7**. Les mécanismes cellulaires impactés dans la MH sont développés dans les sous-parties suivantes.





**Figure 7 : Schéma représentant les mécanismes cellulaires pathologiques dans la MH.**

1) Traduction majoritaire de muHTT (isoforme longue) et d'un fragment N-terminal provenant d'un épissage aberrant. 2) Clivage de muHTT à différents endroits pour générer d'autres fragments N-terminaux. 3) Entrée de muHTT dans le noyau. 4) Oligomérisation et agrégation de muHTT conduisant à des inclusions intranucléaires responsables de la dérégulation transcriptionnelle notamment. 5) Oligomérisation et agrégation de muHTT dans le cytoplasme. 6) Amplification du processus d'agrégation due à un défaut de clairance. 7) Dérèglements cellulaires, tels que les problèmes de transport axonal, de toxicité mitochondriale et de dysfonction synaptique, entraînés par l'ensemble des formes de muHTT ; (Bates *et al.*, 2015).

#### i. Mauvais repliement et agrégation

L'expansion de polyglutamine forme des feuillets  $\beta$  dans muHTT entraînant ainsi son oligomérisation et son agrégation dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau des neurones (Davies *et al.*, 1997; DiFiglia *et al.*, 1997). Cependant, les inclusions intracellulaires neuronales, qui constituent une caractéristique principale de la MH, sont également présentes dans les cellules qui ne sont pas les plus vulnérables, comme les interneurons.

De la même façon, les agrégats sont retrouvés en plus grand nombre dans le cortex que dans le striatum (Kuemmerle *et al.*, 1999). De récentes suggestions font l'hypothèse que ces agrégats seraient au contraire neuroprotecteurs, et que seules les formes intermédiaires conduisant à leur formation seraient pathogéniques (Saudou *et al.*, 1998). Même si le mécanisme selon lequel l'expansion de polyglutamine confère une propriété toxique à la huntingtine est encore méconnu, la formation de ces agrégats entraîne des problèmes de clairance et d'interactions notamment.

#### ii. Défaut de clairance

Les deux mécanismes permettant la dégradation des protéines, à savoir le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie, sont impactés dans la MH (Bence *et al.*, 2001; Holmberg *et al.*, 2004). Les agrégats contiennent de l'ubiquitine et co-localisent avec les sous-unités du protéasome, ce qui laisse penser que muHTT est une cible pour UPS. Cependant, il est possible que les inclusions de muHTT séquestrent des composants du système, empêchant ainsi leur dégradation. De plus, la conformation des expansions de polyglutamine n'est pas optimale pour entrer dans le site catalytique du protéasome (Zheng et Diamond, 2012).

#### iii. Clivage protéolytique

La protéolyse de la huntingtine génère la formation de fragments N-terminaux contenant l'expansion de polyglutamine, et semble donc être une étape cruciale dans la physiopathologie de la MH. Les fragments générés ont tendance à s'agréger davantage, à rentrer plus facilement dans le noyau et à induire une toxicité neuronale (Landles *et al.*, 2010 ; Zheng et Diamond, 2012). De nombreuses protéases ont été décrites comme permettant le clivage de la huntingtine, mais des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer l'implication de celles-ci dans la MH. Le clivage de muHTT par la caspase 6 semble être un événement important dans la pathologie car des souris résistantes à cette caspase ne montrent pas de neurodégénérescence malgré l'expression de la forme mutée de la huntingtine (Graham *et al.*, 2006).

#### iv. Dérégulation transcriptionnelle

L'expansion de polyglutamine peut se lier et changer l'activité de nombreux facteurs de transcription, comme par exemple CBP (CREB-binding protein) et p53 (Steffan *et al.*, 2000)

qui est notamment responsable de l'augmentation de l'expression de la caspase 6 (Ehrnhoefer *et al.*, 2014). A l'inverse, muHTT lie moins fortement REST/NRSF, conduisant ainsi à l'accumulation de ce facteur dans le noyau qui va alors inhiber la synthèse de BDNF. Ainsi, le BDNF est moins exprimé chez les patients atteints de la MH conduisant à la mort des neurones striataux (Zuccato, 2001).

#### v. Dysfonction mitochondriale

Il a été montré que l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, telles que les complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, est diminuée chez les patients et les souris MH (Arenas *et al.*, 1998 ; Gu *et al.*, 1996). En effet, muHTT endommage les mitochondries par divers mécanismes, comme l'altération de l'homéostasie calcique. Les mitochondries produisent alors moins d'énergie et deviennent une source importante de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) conduisant à une excitotoxicité qui rend les cellules neuronales plus vulnérables (Choo, 2004 ; Panov *et al.*, 2002 ; Polidori *et al.*, 1999).

#### vi. Détérioration du transport axonal

Le défaut de transport axonal observé dans la MH est dû à un déficit de liaison entre les microtubules et les protéines motrices, telle que la kinésine. Cela s'explique notamment par une désacétylation des microtubules (Millecamps et Julien, 2013) et une augmentation de la phosphorylation de la kinésine *via* l'activation de JNK3 (c-Jun N-terminal kinase) (Morfini *et al.*, 2009), qui empêchent l'interaction entre ces deux molécules. Ce dérèglement du transport axonal entraîne donc une coupure de communication au sein du circuit cortico-striatal, diminuant ainsi la quantité de BDNF délivrée au niveau du striatum.

Compte tenu de l'ensemble de ces dysfonctionnements cellulaires et moléculaires, ainsi que de la nature ubiquitaire de HTT, il n'est pas surprenant de noter également une atteinte périphérique chez les patients (van der Burg *et al.*, 2009). Ces derniers souffrent notamment d'atrophie des muscles squelettiques et des testicules et, bien que le mécanisme ne soit pas encore élucidé, il semblerait que cela soit dû à la présence de muHTT dans les différents types cellulaires plutôt qu'à un effet secondaire de la neurodégénérescence (Arenas *et al.*, 1998).

b. Une question subsiste : La MH, gain ou perte de fonction ?

Deux grandes hypothèses se font actuellement face pour expliquer les dérèglements observés dans la MH : la perte de fonction de la protéine sauvage, ou le gain de fonction de la protéine mutée.

i. Gain de fonction

Pendant très longtemps, la MH a été expliquée par le gain de fonction de la protéine mutée. Plusieurs données soutiennent cette hypothèse. Par exemple, certains patients sont homozygotes pour muHTT et ne possèdent donc pas de huntingtine sauvage. Étonnamment, ils ne présentent ni un phénotype aggravé, ni une apparition précoce de la maladie, indiquant que la protéine mutée peut également jouer le rôle physiologique de HTT, notamment dans le développement (Myers *et al.*, 1989 ; Wexler *et al.*, 1987). Cela signifie que ce n'est pas la perte de fonction de la huntingtine sauvage qui est en cause. Cependant, étant donné l'hétérogénéité des symptômes et les différences dans l'âge d'apparition de la MH, il est difficile de certifier que le phénotype est similaire entre des patients hétéro- et homozygotes (Cattaneo *et al.*, 2001). De plus, les patients qui expriment deux fois moins de protéine HTT à cause d'une translocation ou d'une délétion au niveau du locus *HTT* ne présentent pas de phénotype (Ambrose *et al.*, 1994). De la même façon, il a été décrit que les souris adultes déplétées en HTT ne meurent pas, ce qui semble suggérer que ce n'est pas la perte de la huntingtine qui induit la MH (Wang *et al.*, 2016).

D'autre part, la MH fait partie des pathologies par expansion de polyglutamine car, comme dans les 8 autres maladies neurodégénératives, ces répétitions sont toxiques. La différence de symptômes entre ces affections étant entre autres les types neuronaux affectés, cela s'explique probablement par la fonction de chacune des protéines sauvages touchées par les répétitions CAG (Paine, 2015). Une étude a d'ailleurs montré que l'ajout de répétitions CAG dans le gène *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) murin, qui n'est impliqué à l'origine dans aucune maladie, entraîne des inclusions intranucléaires et une atteinte neurologique conduisant à une mort précoce des animaux (Ordway *et al.*, 1997). De plus, le fait qu'un nombre important de répétitions soit associé avec un phénotype sévère et une apparition précoce de la maladie apporte un soutien supplémentaire à cette hypothèse

(Furtado *et al.*, 1996). Il est donc admis que les expansions de polyglutamine confèrent un gain de fonction toxique.

Afin de connaître l'implication de HTT, des chercheurs ont généré une souche de souris n'exprimant pas la huntingtine endogène murine mais uniquement muHTT humaine, avec 128 répétitions CAG (nommée YAC128-/-), et l'ont comparée avec une souche classique YAC128 qui contient à la fois le transgène humain et les deux allèles murins sauvages (pour plus de détails sur les souris YAC128, voir la partie modèles animaux). Les résultats ne montrent pas de différences entre ces deux souches concernant le volume du striatum, le nombre de neurones ainsi que l'expression de DARPP-32, marqueur des neurones du striatum (Van Raamsdonk, 2005). Cependant, la souris YAC128-/- présente des problèmes moteurs, une atrophie des testicules et une hypoactivité. Sa durée de vie est aussi plus courte que la souche classique.

Ainsi, il semblerait que le gain de fonction toxique de muHTT soit la cause principale de la neurodégénérescence observée dans la MH. Néanmoins, la pathologie paraît exacerbée par la diminution de HTT sauvage (Paine, 2015).

## ii. Perte de fonction

Une étude a également montré que le niveau de HTT sauvage chez les souris transgéniques R6/2 diminue au cours de l'âge, alors qu'il a plutôt tendance à augmenter chez les souris sauvages (Zhang *et al.*, 2003). Cette diminution peut s'expliquer par une potentielle séquestration de HTT sauvage par muHTT, l'empêchant ainsi de jouer son rôle et exacerbant le phénotype (Cattaneo *et al.*, 2001). Par exemple, il est largement décrit que les cerveaux de patients ou de souris MH ont une concentration réduite en BDNF. Cependant, il reste difficile de déterminer si la déplétion en BDNF est une cause ou une conséquence de la diminution de la quantité de HTT sauvage (Paine, 2015).

De plus, l'inactivation conditionnelle du gène *Hdh* murin dans le cerveau de souris entraîne une neurodégénérescence progressive, ce qui soutiendrait l'hypothèse de la perte de fonction de HTT sauvage dans la pathogénèse de la MH (Dragatsis *et al.*, 2000).

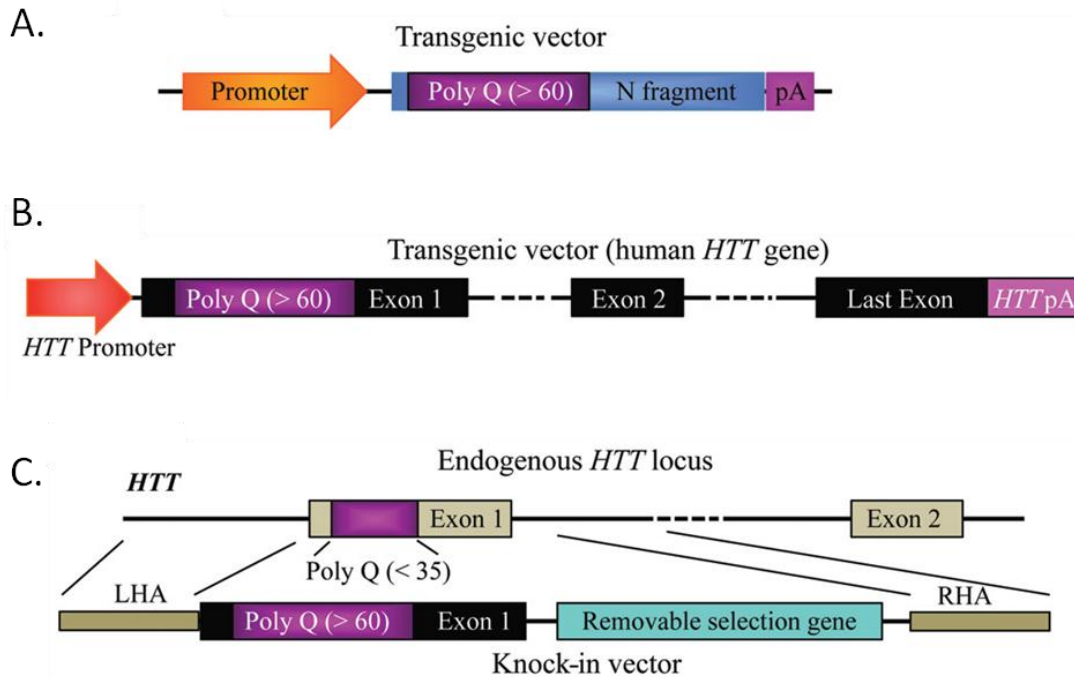
Bien que des recherches soient encore nécessaires pour comprendre la véritable implication des différentes formes protéiques dans la MH, l'ensemble de ces études nous donne des

informations essentielles sur les stratégies à adopter pour traiter la MH. L'ajout de HTT sauvage ne semble pas être un traitement adéquat, alors que la diminution de muHTT, en préservant le plus possible l'expression de HTT sauvage, semble être idéale.

### E. Modèles animaux

Afin de comprendre la physiopathologie de la MH et également d'évaluer les approches thérapeutiques, il est nécessaire d'établir des modèles animaux de cette maladie. Les premiers modèles de la MH sont apparus bien avant la découverte de la mutation génétique, et se sont donc basés sur les lésions neuronales observées chez les patients. Ainsi, la neurodégénérescence peut être mimée en injectant des produits neurotoxiques (Ramaswamy *et al.*, 2007), comme l'acide kaïnique et l'acide quinolinique qui sont des agonistes du glutamate (Beal *et al.*, 1986 ; McGeer et McGeer, 1976), mais également des toxines mitochondriales comme l'acide 3-nitropropionique (3-NPA) (Brouillet *et al.*, 1993). Après l'identification du gène à l'origine de la pathologie, différents modèles génétiques ont alors été générés permettant l'expression de muHTT et donc d'un phénotype plus proche de celui de l'homme (Pouladi *et al.*, 2013). Bien qu'il existe des modèles transgéniques de vers *Caenorhabditis elegans* et de mouches *Drosophila melanogaster*, les plus utilisés sont les rongeurs qui peuvent être catégorisés selon leur modification génétique (**Figure 8**). Il est également possible de générer des modèles animaux en surexprimant muHTT grâce à l'utilisation de vecteurs viraux (Ruiz et Déglon, 2012). Cette approche, qui ne sera pas développée ici, comporte divers avantages, comme l'apparition rapide de problèmes moteurs et comportementaux et la possibilité d'utiliser le même animal comme contrôle interne si l'expression du transgène est limitée à un hémisphère.

Nous nous intéresserons dans cette partie aux lignées de rongeurs génétiquement modifiés.



**Figure 8 : Schéma des différentes stratégies de modifications génétiques utilisées pour générer des modèles animaux pour la MH.**

**A.** Expression du fragment N-terminal de HTT avec un nombre pathologique de répétitions CAG. **B.** Expression du gène *HTT* muté entier, avec son propre promoteur et ses régions régulatrices. **C.** Remplacement ciblé de l'exon 1 murin par l'exon 1 humain muté pour générer un *knock-in*, (adaptée de Holm *et al.*, 2016).

### 1. Modèles transgéniques de rongeurs contenant la partie 5' du gène *HTT*

De par la grandeur du gène *HTT* (180 kb) (Ambrose *et al.*, 1994), les premiers modèles de souris transgéniques contiennent uniquement une petite portion du gène, incluant l'exon 1 avec un nombre important de répétitions CAG (**Figure 8A**).

Ces souris présentent généralement un phénotype très prononcé par rapport aux autres modèles et développent des problèmes moteurs ainsi qu'une mort prématurée (Menalled *et al.*, 2009). Cela a d'ailleurs démontré que l'expression du fragment N-terminal de HTT est suffisante pour entraîner un phénotype proche de celui de la MH. Par exemple, les souris R6/1 et R6/2, qui diffèrent entre autres par leur nombre de répétitions CAG, expriment uniquement l'exon 1 de l'*HTT* humain, sous le contrôle du promoteur *HTT* humain (Mangiarini *et al.*, 1996). La souche la plus utilisée jusqu'à aujourd'hui est la R6/2 avec approximativement 144 répétitions CAG car elle présente le phénotype le plus marqué. Il a été reporté que ces répétitions sont instables et sont souvent plus grandes que prévues initialement (Menalled *et al.*, 2014). Ce large nombre de répétitions correspond à une forme

juvénile de la MH. Ces souris développent, en effet, des symptômes moteurs et cognitifs dès 1 mois et ne survivent généralement pas plus de 4 mois et demi (Lione *et al.*, 1999).

Un autre modèle exprimant uniquement le fragment N-terminal est la souris N171-82Q, contenant 171 AA de la huntingtine avec 82 glutamines, sous le contrôle d'un promoteur de la protéine prion murine permettant l'expression de ce transgène essentiellement dans le cerveau, et plus particulièrement dans les neurones (Schilling, 1999). Ce modèle possède moins de répétitions CAG, ayant pour impact une apparition de la pathologie plus tardive que pour les souris R6/1 et R6/2. Les symptômes moteurs et cognitifs apparaissent aux alentours du 3<sup>ème</sup> mois, ce qui permet l'obtention d'un modèle plus fidèle à la MH adulte. Les souris N171-82Q ont néanmoins également une durée de vie réduite, de 5 à 6 mois (McBride *et al.*, 2006 ; Menalled *et al.*, 2014 ; Ramaswamy *et al.*, 2007). Un modèle de rat transgénique a également été généré à l'aide d'un fragment d'ADNc *HTT* contenant 51 répétitions CAG sous le contrôle du promoteur *HTT* de rat (von Horsten *et al.*, 2003). Il présente un phénotype neurologique avec des problèmes cognitifs et moteurs.

Les modèles transgéniques contenant uniquement un fragment du gène *HTT* humain n'ont pas pu être utilisés dans ce projet car l'évaluation des stratégies thérapeutiques nécessitent l'intégralité du gène.

## 2. Modèles transgéniques de rongeurs contenant l'intégralité du gène *HTT*

Peu de temps après sont apparus les modèles contenant l'intégralité du gène *HTT* humain, sous le contrôle de son promoteur humain et des éléments régulateurs. Pour cela, différentes équipes ont utilisé des YAC (Yeast Artificial Chromosome) ou BAC (Bacterial Artificial Chromosome) pour modifier génétiquement des souris et leur faire exprimer, en plus de la huntingtine murine endogène, la huntingtine humaine mutée (**Figure 8B**). Les plus utilisées sont les souris YAC128 (Slow, 2003) et BACHD (Gray *et al.*, 2008) contenant respectivement 128 et 97 glutamines. De manière intéressante, la queue polyglutamine est codée par des CAG espacés par des CAA (codant également pour une glutamine) qui permettent d'empêcher une expansion des répétitions (Gray *et al.*, 2008 ; Menalled *et al.*, 2014 ; Slow, 2003). Contrairement aux modèles transgéniques exprimant uniquement le fragment N-terminal, les YAC128 et BACHD présentent un phénotype beaucoup plus tardif et une durée de vie relativement normale. Les problèmes moteurs apparaissent aux alentours



de 6 mois chez la souris YAC128 et sont notamment visibles au rotarod (Slow, 2003). Ils s'accompagnent d'une augmentation de HTT nucléaire. La neurodégénérescence du striatum est visible à partir de 9 mois, alors que le cortex est affecté à partir d'un an. Les agrégats de muHTT sont diffus au sein des neurones, s'accumulent et sont visibles dans le striatum à partir de 12 mois. La souris BACHD présente, elle, des problèmes de coordination motrice dès 2 mois et les agrégats de muHTT sont détectés dans le cortex et très faiblement dans le striatum (Gray *et al.*, 2008). De manière surprenante, alors que les patients atteints de la MH souffrent d'une perte de poids, ces deux lignées de souris transgéniques présentent une augmentation de la masse corporelle. Il faut donc être vigilants lors de l'interprétation des tests moteurs puisque le poids peut aussi influencer le niveau d'activité des souris (Menalled *et al.*, 2014). Il existe également un rat BACHD, contenant lui aussi 97 répétitions CAG/CAA mais n'exhibant pas de prise de poids (Yu-Taeger *et al.*, 2012).

Etant donné que les souris BACHD contiennent autant de CAG que de CAA codant pour les 97 glutamines, nous avons choisi la souris YAC128 qui contient uniquement 7% de CAA, ce qui est plus ressemblant à ce qui est retrouvé chez l'homme (Pouladi *et al.*, 2012). De plus, puisque nous voulons, entre autres, cibler les répétitions CAG, il est important que les molécules antisens puissent s'y fixer et donc que ces triplets soient majoritaires.

Récemment, les souris BACHD et YAC18 (transgène *HTT* humain wild-type comportant seulement 18 répétitions CAG) ont été utilisées et croisées avec des souris *Hdh*<sup>+/-</sup> afin de créer une lignée nommée Hu97/18 qui est *Hdh*<sup>-/-</sup> (Southwell *et al.*, 2013). Cette lignée est donc totalement humanisée vis-à-vis du gène *HTT* car elle possède deux allèles avec 97 et 18 répétitions CAG, en absence du gène *Hdh* murin. Globalement, les souris Hu97/18 présentent un phénotype relativement similaire aux souris BACHD. Très récemment, les chercheurs de la même équipe ont généré une lignée appelée Hu128/21 selon le même procédé, mais avec des souris YAC128 au lieu des BACHD (Southwell *et al.*, 2017).

### 3. Modèles *knock-in* de rongeurs

Une autre technique, schématisée dans la **figure 8C**, consiste à introduire des répétitions CAG directement dans le gène *Hdh* murin. Les souris les plus étudiées sont les lignées *Hdh*Q111 (Wheeler, 1999), *Hdh*Q150 (Lin *et al.*, 2001), CAG140KI et zQ175 (Menalled *et al.*, 2012) contenant respectivement 111, 150, 140 et 190 glutamines. Les modèles *knock-in* ont

donc l'avantage d'exprimer muHTT dans le contexte du gène *HTT* endogène, contrairement aux souris transgéniques où l'intégration aléatoire du transgène peut affecter son expression. Le phénotype de ces souris est très léger, ce qui explique que la plupart des études utilisant ces animaux choisissent des souris *knock-in* homozygotes qui ont un phénotype plus marqué (Menalled *et al.*, 2014).

#### 4. Grands modèles animaux

Différents groupes ont développé des modèles animaux plus grands afin de pouvoir évaluer l'effet de la huntingtine mutée à long terme, sur des êtres vivants ayant une espérance de vie plus longue que celle des rongeurs. D'autre part, il est également intéressant d'étudier la MH dans des animaux dont la taille du cerveau se rapproche de celle de l'homme, notamment pour des questions d'administration et de biodistribution des molécules thérapeutiques. Ainsi, ces dernières années, différents modèles ont été générés, comme un singe rhésus exprimant l'exon 1 du gène *HTT* humain avec 84 répétitions CAG. Ces primates transgéniques présentent cependant des problèmes de reproduction et de longévité (Yang *et al.*, 2008) ce qui en complique leur utilisation. Un modèle de mouton a également été créé, en intégrant un transgène contenant l'intégralité de l'ADNc de *HTT* humaine avec 69 répétitions CAG (Jacobsen *et al.*, 2010). De même, des équipes ont développé des cochons nains transgéniques exprimant 124 glutamines (Baxa *et al.*, 2013). Globalement, ces animaux ne présentent pas un phénotype très marqué mais peuvent être intéressants notamment dans l'évaluation à long-terme du profil toxicologique des molécules thérapeutiques.

## II. Traitements et essais thérapeutiques en cours

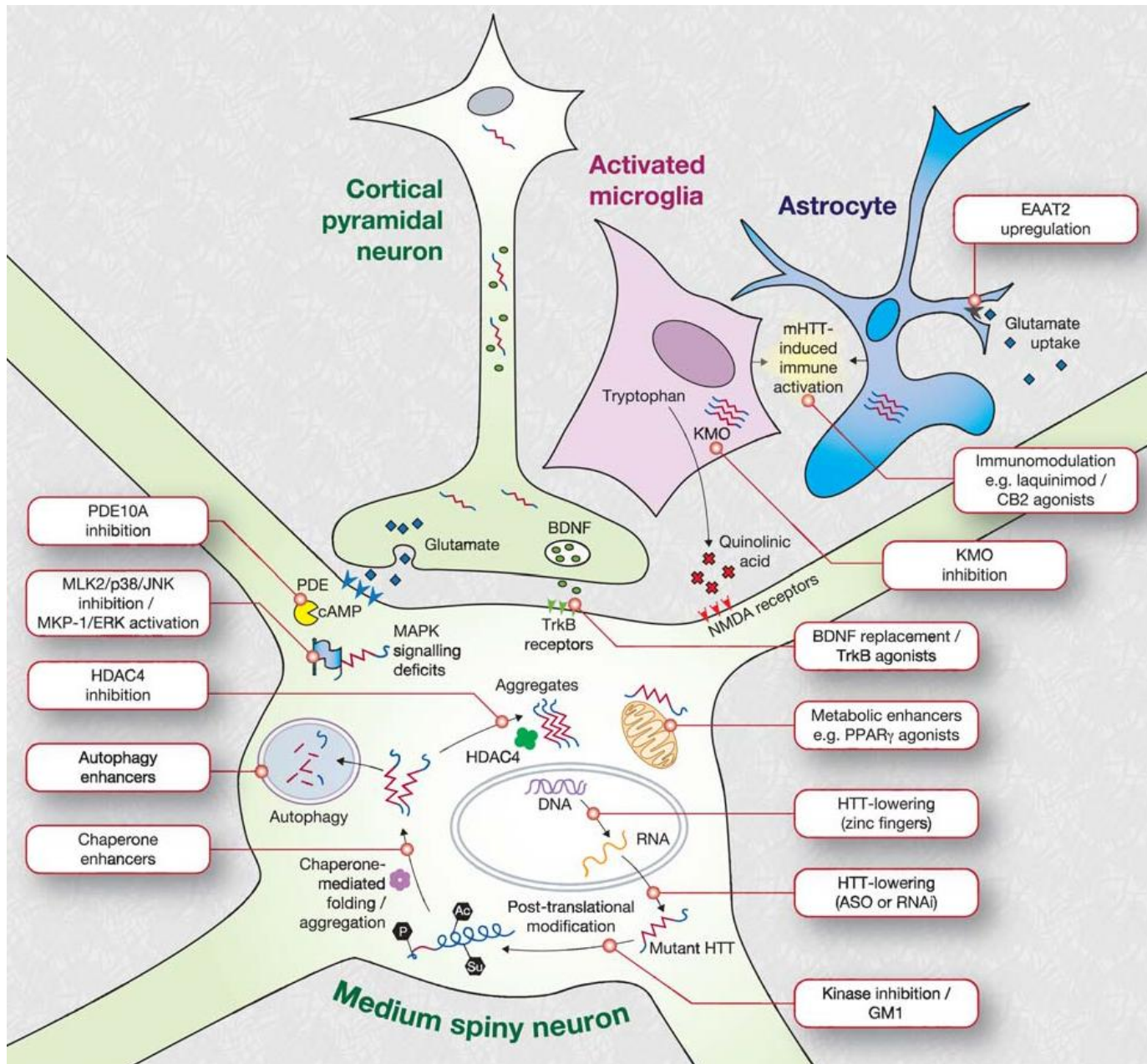
Comme précédemment évoqué, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif de la MH. Ainsi, les traitements administrés aux patients sont uniquement symptomatiques, à savoir la tétrabénazine ou la deutétabénazine (autorisée depuis le 3 avril 2017) qui sont les seules médications approuvées pour traiter les mouvements choréiques (Huntington Study Group, 2006). Cet inhibiteur du transport des monoamines permet une déplétion en dopamine au niveau du système nerveux central, permettant de réduire les mouvements choréiques. D'autres médicaments indiqués pour la dépression, les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer peuvent aussi être utilisés pour la MH (Shannon et Frait, 2015). Par exemple, des anti-dépresseurs de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine ou des benzodiazépines peuvent être administrés pour traiter l'anxiété, la dépression et l'irritabilité. Certains patients ont également besoin d'anti-psychotiques et d'anti-épileptiques.

Le plus souvent, en plus de la prise en charge médicamenteuse, un accompagnement social et psychologique est mis en place pour le patient et sa famille. Afin de préserver le plus longtemps possible l'autonomie du patient, des kinésithérapeutes, diététiciennes et orthophonistes peuvent aussi intervenir (Bachoud-Lévi *et al.*, 2009).

La communauté de chercheurs concentre ses efforts sur la découverte de nouveaux traitements pharmacologiques.

### A. Agents pharmacologiques

Bien que la physiopathologie de la MH ne soit pas encore totalement élucidée, tous les dérèglements cellulaires sont de potentielles cibles thérapeutiques (**Figure 9**). Les agents pharmacologiques en cours de développement sont exposés dans les sous-parties suivantes.



**Figure 9 : Schéma représentant les différentes cibles thérapeutiques étudiées pour la MH.**

EAAT2 : Excitatory Amino Acid Transporter 2 ; KMO : Kynurénine MonoOxygénase ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor ; PDE10A : Phosphodiesterase 10A ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; HDAC : Histone Désacétylase ; TrkB : tropomyosin receptor kinase B ; ASO : Antisense Oligonucleotide ; RNAi : ARN interférence, (Wild et Tabrizi, 2014).

### 1. Agir sur l'autophagie

L'augmentation de la dégradation de muHTT par les deux mécanismes assurant cette fonction dans la cellule, à savoir le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie, est une approche pharmacologique explorée dans le traitement de la MH (Kaganovich *et al.*, 2008). En effet, l'utilisation de rapamycine, un immunosuppresseur capable d'inhiber la

protéine mTor, entraîne une diminution du nombre d'agrégats de muHTT ainsi qu'une amélioration du phénotype chez des modèles de souris de la MH (Bové *et al.*, 2011; Ravikumar *et al.*, 2004). Cette stimulation de l'autophagie semble, par contre, efficace uniquement à un stade précoce de la maladie, lorsque les gros agrégats très stables ne sont pas encore formés. Les mêmes résultats sont obtenus avec d'autres types de molécules capables de promouvoir l'autophagie, comme le lithium, la carbamazépine et le tréhalose (Renna *et al.*, 2010). Cependant, une nouvelle étude publiée en 2015 montre une amélioration du phénotype de souris MH après activation de l'activité de mTOR (Lee *et al.*, 2015). Cela montre, une fois encore, la complexité de la physiopathologie de la MH et de l'autophagie puisque d'autres mécanismes compensatoires peuvent se mettre en place.

## 2. Agir sur les molécules chaperonnes

Des études ont également montré que les protéines chaperonnes peuvent réduire la neurodégénérescence survenant dans la MH, notamment en agissant sur le mauvais repliement de muHTT. Par exemple, la surexpression de Hsp40 (Heat Shock Protein) et Hsp70 supprime la neurotoxicité en empêchant muHTT de s'agréger (Muchowski *et al.*, 2000). Ainsi, différentes molécules chaperonnes ont été testées et les résultats semblent prometteurs (Labbadia *et al.*, 2012 ; Sontag *et al.*, 2013).

## 3. Cibler l'activité des caspases

Il a été montré que la mutation des sites de clivage par les caspases afin de diminuer la protéolyse empêche la neurodégénérescence et améliore le phénotype des souris (Graham *et al.*, 2006). La minocycline, qui est un antibiotique, inhibe les caspases 1 et 3 et entraîne un retard dans la progression de la maladie chez la souris R6/2 (Chen *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2003). Ce médicament est aussi en essai clinique pour la MH (Huntington Study Group DOMINO Investigators, 2010).

## 4. Inhiber les HDAC

L'utilisation d'inhibiteurs des HDAC (Histones Désacétylases) est également une stratégie envisagée car il a été montré que muHTT diminue l'acétylation des histones. En effet, des molécules comme le vorinostat (Hockly *et al.*, 2003), le phénylbutyrate (Gardian *et al.*, 2005) ou le butyrate de sodium (Ferrante *et al.*, 2003) qui corrigent l'hypoacétylation, ont permis d'obtenir, après traitement de souris MH, une amélioration de leur phénotype. De manière

intéressante, elles n'induisent pas de diminution de l'agrégation de muHTT, alors que l'inhibition des HDAC pourrait aussi acétyler la protéine mutée elle-même, ou des gènes impliqués dans le système UPS, et donc augmenter sa clairance (Jia *et al.*, 2012). Les effets neuroprotecteurs des inhibiteurs des HDAC impliquent également une amélioration du métabolisme calcique des mitochondries qui est impacté dans la MH (Oliveira *et al.*, 2006). D'autre part, l'inhibition des HDAC augmente l'acétylation de la tubuline, ce qui améliore le transport axonal et donc la libération de BDNF (Dompierre *et al.*, 2007). De manière encourageante, le selisstat, un inhibiteur de HDAC, est actuellement en essai clinique et est bien toléré par les patients (Süssmuth *et al.*, 2015).

L'hydroxyquinoline (PBT2), un composant déjà en essai clinique de phase II pour la maladie d'Alzheimer et réduisant aussi l'agrégation protéique mais sans agir sur les HDAC, est également en essai clinique pour la MH (Huntington Study Group Reach2HD Investigators, 2015).

#### 5. Agir sur les kinases

Les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de muHTT sont également des cibles potentielles puisqu'il est connu que certaines d'entre elles ont un effet positif ou négatif sur la toxicité. Par exemple, la phosphorylation des sérines 13 et 16 réduit la toxicité de muHTT (Gu *et al.*, 2009), et entraîne une augmentation de sa localisation nucléaire (Atwal *et al.*, 2011). La sérine 421 est également un lieu de modification important puisque sa phosphorylation restaure les transports axonaux antérograde et rétrograde, et notamment le transport du BDNF (Zala *et al.*, 2008). Ainsi, les kinases ou leurs inhibiteurs peuvent être de potentiels outils thérapeutiques, bien qu'il semble délicat que leurs actions n'affectent pas d'autres sites de muHTT ou d'autres protéines. Différents agents pharmacologiques, comme le ganglioside GM1 (Di Pardo *et al.*, 2012) ou l'analogue synthétique de la sphingosine (fingolimod) (Di Pardo *et al.*, 2014), induisent également une amélioration de la fonction motrice et un prolongement de la durée de vie chez les souris R6/2. Leur mécanisme d'action est encore inconnu, mais de manière intéressante ces molécules augmentent également l'expression de BDNF et la phosphorylation de HTT sur les sérines 13 et 16 .

## 6. Inhiber les phosphodiésterases

La déficience de la voie de signalisation de l'AMPC est également une caractéristique de la MH. La phosphodiésterase (PDE) 10A est impliquée dans la régulation de l'AMPC et est pratiquement uniquement exprimée dans le striatum (Coskran *et al.*, 2006). Des études pré-cliniques montrent le bénéfice d'un inhibiteur de PDE10A sur le phénotype de la souris R6/2 par exemple (Giampà *et al.*, 2010), mais le laboratoire pharmaceutique Pfizer a annoncé récemment l'arrêt de l'essai clinique par manque d'efficacité de cette molécule. L'utilisation d'inhibiteur de phosphodiésterase reste actuellement en étude, avec l'inhibiteur de PDE4 par exemple, qui, en plus de son effet anxiolytique (Rutter *et al.*, 2014), a démontré un effet neuroprotecteur chez la souris R6/2 (DeMarch *et al.*, 2008). Cette molécule est actuellement en essai clinique et semble pour le moment bien tolérée par les patients.

## 7. Réguler la voie de signalisation des MAPK

La voie de signalisation très complexe des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), et notamment JNK (c-Jun terminal kinases), ERK (Extracellular signal-regulated kinases) et p38, est également dérégulée dans la MH (Gianfriddo *et al.*, 2004) ce qui a permis d'identifier différentes cibles au sein de cette voie de signalisation. L'activation ou l'inhibition de ces protéines a effectivement un effet sur les performances motrices et le niveau de BDNF chez la R6/2 (Apostol *et al.*, 2008 ; Taylor *et al.*, 2013) ainsi que dans d'autres modèles animaux (Vázquez-Manrique *et al.*, 2016), bien que leur implication dans la MH ne soit pas encore totalement comprise.

## 8. Réguler la voie de signalisation de la kynurénine

Il est également important de garder en mémoire que muHTT n'est pas seulement exprimée dans les neurones, mais aussi dans les autres cellules du système nerveux central comme les cellules gliales. Ces cellules sont d'ailleurs le lieu d'une autre voie de signalisation, celle de la kynurénine, qui permet la dégradation du tryptophane (Vécsei *et al.*, 2012). La kynurénine monooxygénase (KMO) en est une enzyme importante : elle permet de réguler la quantité d'acide quinolinique (QA), un composé neurotoxique, et d'acide kynurénique (KA) qui est lui neuroprotecteur. Ces métabolites sont dérégulés dans la MH, avec une augmentation du niveau de QA et une diminution de KA dans les cerveaux de patients (Beal *et al.*, 1992 ; Guidetti *et al.*, 2004). Ainsi, l'enzyme KMO est également une potentielle cible thérapeutique. Des études utilisant des inhibiteurs de KMO montrent d'ailleurs une

amélioration du phénotype dans des modèles murins de la MH (Beaumont *et al.*, 2016 ; Zwilling *et al.*, 2011).

### 9. Inhiber la voie de signalisation de la sémaphorine 4D (SEMA4D)

Des études récentes ont identifié la sémaphorine 4D comme étant dérégulée dans la MH, car elle participerait notamment à la neuroinflammation et à l'activation des cellules gliales. L'utilisation d'anticorps anti-SEMA4D, nommés VX15, améliore le phénotype chez la YAC128, avec une réduction de l'atrophie striatale et une diminution des troubles cognitifs et anxieux (Smith *et al.*, 2015 ; Southwell *et al.*, 2015). Par contre, la motricité ne semble pas améliorée en traitant les animaux avec cet anticorps. Ce dernier est néanmoins actuellement en essai clinique de phase II.

### 10. Moduler la réponse immunitaire

Des recherches sont également effectuées sur l'hyperactivité du système immunitaire, périphérique mais aussi dans le SNC par les astrocytes et les cellules gliales, dont l'effet est médié, entre autres, par la voie de signalisation de NFκB (Björkqvist *et al.*, 2008 ; Träger *et al.*, 2014). Ainsi, le laquinimod, un immuno-modulateur, est entré en essai clinique de phase II après avoir démontré son efficacité à réduire l'activation de NFκB (Brück *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action de cet agent pharmacologique n'est pas connu, mais il serait aussi capable de restaurer l'expression de BDNF et interviendrait également dans la voie des MAPK en diminuant la phosphorylation de p38 (Aharoni *et al.*, 2012).

### 11. Diminuer l'excitotoxicité en agissant sur le glutamate

L'excitotoxicité responsable de la mort neuronale est essentiellement due au glutamate. Ainsi, des inhibiteurs de la neurotransmission glutamatergique, comme le riluzole, ont été testés. Ce dernier n'a cependant pas montré d'effets bénéfiques suffisants en essai clinique de phase III (Landwehrmeyer *et al.*, 2007).

L'acide glutamique présent dans les fentes synaptiques est notamment recapté par les EEAT2 (Excitatory Amino Acid transporter 2), qui sont principalement exprimés au niveau des astrocytes. Une des stratégies thérapeutiques pour la MH est donc d'augmenter la quantité de transporteurs de glutamate, mode d'action du ceftriaxone, qui a démontré une bonne efficacité chez la souris R6/2 (Miller *et al.*, 2008).



### 12. Rétablir les dysfonctions mitochondriales

Le stress oxydatif engendré par la détérioration des fonctions mitochondriales qui survient dans la MH, peut être diminué par des anti-oxydants, comme la créatine et le coenzyme Q10 (Huntington Study Group Pre2CARE Investigators, 2010 ; Rosas *et al.*, 2014). Les essais cliniques portant sur ces deux molécules ont dû être arrêtés en phase III à cause d'un manque d'efficacité (McGarry *et al.*, 2017). Utilisant la même stratégie, un nouvel essai clinique en phase I/II a commencé début mai 2017 avec la molécule SBT-20. Cette dernière a, en effet, la capacité de restaurer les propriétés physiques et biochimiques des mitochondries atteintes dans la MH (Stealth BioTherapeutics Inc.) et paraît donc aussi prometteuse.

### 13. Augmenter la quantité de BDNF

Le BDNF, facteur neurotrophique, agit principalement par son récepteur TrkB (tropomyosin receptor kinase B). Des chercheurs ont donc testé des agonistes de TrkB qui démontrent une amélioration des fonctions motrices, de la durée de vie et de l'atrophie du striatum chez les souris N171-82Q et R6/2 (Jiang *et al.*, 2013 ; Simmons *et al.*, 2013 ; Todd *et al.*, 2014). D'autres molécules capables d'augmenter le niveau d'expression de BDNF sont actuellement en essais cliniques, comme le pridopidine (Geva *et al.*, 2016 ; The Huntington Study Group HART Investigators, 2013) et la cystéamine (Verny *et al.*, 2017). Bien que ces molécules semblent bien tolérées par l'organisme, elles peinent à montrer une amélioration significative des symptômes moteurs.

Les niveaux de facteurs neurotrophiques peuvent aussi être restaurés par thérapie cellulaire et génique, comme nous le verrons dans la partie suivante.

L'abondance des cibles thérapeutiques potentielles, représentées schématiquement **figure 9**, démontre une nouvelle fois la physiopathologie très complexe de la MH qui reste pour le moment partiellement élucidée. De même, la description conséquente de l'ensemble des stratégies pharmacologiques montre la panoplie d'approches possibles pour traiter les conséquences de la pathologie. Nous allons maintenant nous intéresser à des approches qui tentent d'intervenir en amont en remplaçant les cellules défectueuses ou en agissant directement au niveau de la cause de la MH : le gène *HTT*.

## B. Thérapie cellulaire

La MH étant caractérisée par une neurodégénérescence progressive du striatum, il est cohérent de s'appliquer à remplacer les cellules détruites par thérapie cellulaire. L'objectif est complexe puisque ces cellules devront rétablir les circuits interrompus.

### 1. Les cellules fœtales

Certains chercheurs se sont intéressés à la greffe de neuroblastes striataux fœtaux dans des modèles de souris (Deckel *et al.*, 1983), de rats (Klein *et al.*, 2013) et de primates non-humains (Kendall *et al.*, 1998). Leurs efforts ont été couronnés de succès puisque les greffons se sont correctement intégrés et les animaux ont montré une amélioration de leur capacité motrice (Kendall *et al.*, 1998).

Différentes équipes à travers le monde ont réalisés des greffes de cellules fœtales et les résultats sont très variables, ce qui peut s'expliquer, entre autres, par la qualité du greffon et de la chirurgie (Bachoud-Lévi et Perrier, 2014). L'étude française a été la première à mettre en avant un bénéfice. En effet, sur les 5 patients traités, 3 ont montré une augmentation de l'activité métabolique du striatum et une amélioration de leurs fonctions motrices et cognitives (Bachoud-Lévi *et al.*, 2000a). Cependant, ce n'est pas un traitement durable puisque les améliorations cliniques s'estompent 4 à 6 ans après la chirurgie (Bachoud-Lévi *et al.*, 2006). Cela pourrait notamment s'expliquer par un défaut de vascularisation du greffon (Cisbani *et al.*, 2013). D'autre part, des problèmes logistiques, de contrôle qualité et d'immunogénicité compliquent l'utilisation de ces cellules (**Tableau I**), favorisant l'intérêt pour les cellules souches (Nicoleau *et al.*, 2011).

### 2. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) (Takahashi *et al.*, 2007) ont un fort potentiel thérapeutique de par leur capacité à produire toutes les cellules du corps, dont les MSN, qui sont les neurones GABAergiques particulièrement affectés dans la MH. Les chercheurs utilisant ces cellules prometteuses ont ainsi été capables d'obtenir des neurones DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein) positifs, marqueurs des MSN, *in vitro* et *in vivo* (Aubry *et al.*, 2008 ; Carri *et al.*, 2013). De plus, les neurones dérivés des hESC ont pu corriger

les déficits moteurs chez un modèle de souris MH, signifiant qu'ils sont capables de reformer une circuiterie neuronale (Ma *et al.*, 2012).

La thérapie cellulaire, bien que prometteuse, est limitée par de nombreux challenges, comme le contrôle de la différenciation vers le type neuronal voulu, l'intégration des cellules dans le tissu hôte, la gestion de leur croissance pour qu'elles ne forment pas de tumeurs, ainsi que la réponse immunitaire suite à la chirurgie (Chen *et al.*, 2014).

Pour éviter les problèmes immunologiques, il est maintenant possible d'obtenir des iPSC à partir de cellules somatiques de patients. Ainsi l'identité cellulaire est la même et le greffon n'est pas rejeté. Cependant, ces cellules contenant toujours la protéine mutée, les symptômes de la maladie risquent de réapparaître (Chen *et al.*, 2014). Cette approche est donc, pour l'instant, principalement utilisée pour modéliser la pathologie et non pour la traiter (Jeon *et al.*, 2012).

**Tableau I : Avantages et inconvénients des cellules fœtales humaines et des cellules souches pluripotentes pour la thérapie cellulaire de la MH.**

(Nicoleau *et al.*, 2011).

Graft origin	Human fetal tissues	Human pluripotent stem cells
Logistics	(-) Limited number of fetus actually available (-) No <i>in vitro</i> amplification (-) Timing of fetus availability (-) No banking possible	(+) <i>In vitro</i> amplification of PSCs (+) <i>In vitro</i> production of graft from PSCs (-) Definitive striatal differentiation protocol still pending (+) Banking
Quality Control	(-) NO STANDARDIZATION (-) No sanitary control on fetal tissue (-) Dissection accuracy	(+) STANDARDIZATION (+) GMP protocols (amplification , banking , differentiation) (+) True QC of PSC and graft (+) Clinic-grade hESC lines available (-) No Clinic-grade hiPSC lines available yet
Immunogenicity	(+) "Organ transplant regulations" (-) No MHC matching=allorejection possible (+) Long term survival of allograft in patient	(-) "Drug regulations" (+) Patient-derived iPSCs (+) Haplotyped iPSCs
Safety issues	(-) Cysts (-) Overgrowth	(-) Neural overgrowth (-) Tumor/teratoma like formation
Therapeutic relevance	(+) Demonstrated reduction of HD symptoms	(-) No data available

*GMP* good manufacturing practices; *HD* Huntington's disease; *hESC* human embryonic stem cells; *iPSCs* induced pluripotent stem cells; *MHC* = ; *PSCs* pluripotent stem cells; *QC* quality control

Une approche combinée pourrait toutefois être envisagée : les cellules somatiques seraient prélevées chez le patient, reprogrammées en iPSC, différenciées en cellules souches neurales (NSC) puis corrigées avant d'être transplantées chez le patient (Chen *et al.*, 2014). Ce travail a été réalisé par une équipe américaine qui a corrigé des iPSC provenant de fibroblastes de patients atteints de la MH par recombinaison homologe. Cette correction permet de reverser le phénotype de la maladie dans les NSC, tout en conservant les caractéristiques pluripotentes des cellules (An *et al.*, 2012).




Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) présentent également un fort intérêt car elles n'induisent pas ou peu de réponses immunitaires, et sécrètent une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance. Elles promeuvent ainsi la régénération de leur microenvironnement en induisant une inhibition de l'apoptose, une stimulation de la mitose et de l'angiogenèse, et une réduction de l'inflammation (Caplan et Dennis, 2006). Ces cellules peuvent être isolées depuis différents endroits, comme le tissu adipeux et le cordon ombilical par exemple (Pittenger, 1999). Des MSC ont ainsi été transplantées chez les souris R6/2 et N171-82Q et ont induit un allongement de la durée de vie des animaux ainsi qu'une diminution des agrégats de muHTT et de la perte des neurones striataux (Lee *et al.*, 2009 ; Moraes *et al.*, 2012). L'effet des MSC est donc bien bénéfique, même si leur capacité à se différencier en neurones reste controversée. Certaines équipes ont aussi tenté de modifier génétiquement les MSC afin qu'elles surexpriment du BDNF. Elles ont également obtenu une amélioration du phénotype chez les souris YAC128 et R6/2 (Dey *et al.*, 2010 ; Pollock *et al.*, 2016). Sachant que des essais cliniques de phase II utilisant des MSC pour traiter des maladies neurodégénératives n'ont montré aucun problème de toxicité, cette approche de MSC/BDNF sera bientôt en essai clinique pour la MH (Deng *et al.*, 2016).

## C. Thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie très prometteuse, qui permet généralement d'exprimer des protéines d'intérêt à l'aide de vecteurs viraux.

### 1. Les vecteurs viraux

De par leur capacité à faire entrer leur matériel génétique dans les cellules cibles, les virus ont été utilisés comme vecteurs de transfert de gènes. Il en existe de nombreux types, mais nous allons brièvement mentionner les trois grandes familles de virus les plus utilisées, à savoir les lentivirus, les adénovirus, ainsi que les AAV (adeno-associated virus), dont les avantages et inconvénients sont listés dans la **figure 10**.

 LENTIVIRUS	 ADENOVIRUS	 ADENO ASSOCIATED VIRUS
<p><b>Advantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Long term gene expression</li> <li>• Transduce dividing and non-dividing cells</li> <li>• High packaging capacity</li> </ul> <p><b>Disadvantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Potential risk of insertional oncogenesis</li> </ul>	<p><b>Advantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• High packaging capacity</li> <li>• High efficiency rate of host cell infection</li> <li>• Low genotoxicity</li> </ul> <p><b>Disadvantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly immunogenic</li> </ul>	<p><b>Advantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Several serotypes – several specific tropisms</li> <li>• Low immunogenicity</li> <li>• Non insertional</li> <li>• Long term gene expression</li> </ul> <p><b>Disadvantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low packaging capacity</li> </ul>

**Figure 10 : Avantages et inconvénients des trois grands types de vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.**

(Imbert *et al.*, 2017)

#### a. Les lentivirus

Les lentivirus font partie de la famille des rétrovirus qui sont des virus enveloppés à ARN. La taille du génome des lentivirus varie de 8 à 12 kb, ce qui en fait un vecteur de choix étant donné sa grande capacité d'emballage (Blessing et Déglon, 2016 ; Serguera et Bemelmans, 2014). Les protéines d'enveloppe assurent leur tropisme. Afin d'augmenter le nombre de cellules cibles pouvant être infectées par les lentivirus, les protéines d'enveloppe sont souvent remplacées par la glycoprotéine VSV-G (vesicular stomatitis virus G) (Naldini, 1998). Ainsi, les vecteurs lentiviraux ont un tropisme beaucoup plus large et sont capables de transduire à la fois des cellules en prolifération comme des cellules quiescentes telles que les neurones (Naldini *et al.*, 1996). L'avantage des lentivirus/rétrovirus est leur capacité à

induire un effet à long terme étant donné qu'ils s'intègrent dans le génome de la cellule hôte. Cependant, cela peut aussi avoir des conséquences néfastes, comme le témoigne le premier essai clinique utilisant des rétrovirus murins (MLV pour Murine leukemia virus), où plusieurs enfants, souffrant initialement de déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS), ont développé une leucémie (Hacein-Bey-Abina, 2003). En effet, l'intégration du vecteur à proximité d'oncogènes peut avoir des conséquences très graves. A l'heure actuelle, le risque de génotoxicité est très largement diminué avec l'apparition des vecteurs SIN (self-inactivating) où les LTR (long terminal repeat) qui sont les promoteurs du virus, sont partiellement délétés (Zufferey *et al.*, 1998). De plus, afin de réduire les risques de réplication du vecteur, la production des lentivirus est maintenant réalisée en quadri-transfection, avec un plasmide transgène SIN et trois plasmides d'empaquetage pour exprimer les gènes *gag*, *pol*, *env* et *rev*.

#### b. Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin, non enveloppés, à capsid icosaédrique. Ils ne s'intègrent pas dans le génome donc sont peu génotoxiques et ont une grande capacité de clonage (Serguera et Bemelmans, 2014). Il existe plus de 100 sérotypes différents, les sérotypes 2 et 5 étant les plus utilisés de par leur capacité à transduire les cellules en division et quiescentes. Les adénovirus ont été les premiers vecteurs à montrer un transfert efficace de gène en transduisant les neurones et les cellules gliales après injection dans le SNC (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Cependant, ils ne sont pas énormément utilisés en clinique à cause de la forte immunogénicité due à leur capsid.

#### c. Les AAV

Les AAV sont largement utilisés pour réaliser des transferts de gènes efficaces. Ce sont des petits virus non enveloppés à ADN simple brin, ce qui limite fortement la capacité de clonage (inférieur à 4 kb) (Blessing et Déglon, 2016 ; Serguera et Bemelmans, 2014). Leur capsid est composée de 3 protéines : VP1, VP2 et VP3. Il existe de nombreux sérotypes présentant des tropismes différents. Dans la plupart des cas, les vecteurs AAV contiennent le génome provenant du sérotype 2 et la capsid provenant d'un autre sérotype pour obtenir un tropisme particulier (Agbandje-McKenna et Kleinschmidt, 2011). Comme on le voit sur le **tableau II**, les différents sérotypes sont plus ou moins efficaces pour transduire les cellules

neuronales ainsi que les cellules gliales. On remarque que l'AAV8, 9, rh8 et rh10 sont d'intérêts particuliers pour cibler les neurones.

**Tableau II : Propriétés des sérotypes principaux d'AAV dans le SNC**

(Murlidharan *et al.*, 2014)

Serotype	Primary receptor	Intra-CSF or intra-parenchymal administration		Intravascular administration		Axonal transport
		Neuronal transduction	Glial transduction	Neuronal transduction	Glial transduction	
AAV1	$\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6 N-linked SA	++	+	+	+	A-,R+
AAV2	Heparan sulfate	+	-	-	-	A+,R-
AAV4	$\alpha$ 2,3 O-linked SA	-	+	-	-	?
AAV5	$\alpha$ 2,3 N-linked SA	++	+	-	-	?
AAV6	$\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6 N-linked SA/heparan sulfate	++	-	+	+	A-,R+
AAV8	?	++	++	++	++	A+, R+
AAV9	Galactose	+++	++	+++	+++	A+,R+
AAVRh.8	?	++	++	+++	+++	?
AAVRh.10	?	+++	+	+++	+++	?

? Receptor usage/axonal transport has not been characterized; + low levels of transduction; ++ moderate levels of transduction; +++ high levels of transduction; - no transduction; ? A+ or R+ (AAV vector undergoes axonal transport in the anterograde (A) or retrograde (R) direction during *in vivo* characterization).

La majorité des vecteurs AAV ne s'intègre pas dans le génome et reste dans la cellule hôte sous forme d'épisome (Duan *et al.*, 1998), c'est pourquoi il est préférable d'utiliser ces vecteurs dans des cellules qui ne se divisent pas ou peu, comme les neurones ou les myocytes afin d'espérer un effet à long terme (Cearley and Wolfe, 2006). En revanche, cette propriété non-intégrative exclut le risque de mutagenèse insertionnelle.

Ces trois types de vecteurs viraux ont été utilisés dans des approches de thérapie génique pour le traitement de la maladie de Huntington, comme détaillé ci-dessous.

## 2. Les transgènes à effet thérapeutique

### a. Les facteurs neurotrophiques

Comme décrit précédemment dans les traitements pharmacologiques, le BDNF est une cible thérapeutique potentielle de par son activité neuroprotectrice. Le transfert du gène BDNF en utilisant un adénovirus (Bemelmans *et al.*, 1999) ou un AAV1/2 (Kells *et al.*, 2004, 2008) a effectivement protégé les neurones striataux de la toxicité induite par l'acide quinolinique. La surexpression de BDNF a également prouvé son efficacité dans des modèles de souris (Giampà *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2010) et de rats transgéniques (Connor *et al.*, 2016).

D'autres facteurs sont également intéressants d'un point de vue thérapeutique, comme le CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor). En effet, une injection d'adénovirus-CNTF dans le striatum de rats permet de protéger les neurones de la toxicité induite par 3-NPA (Mittoux *et al.*, 2002). Une approche différente a également été testée : des fibroblastes (cellules BHK pour Baby Hamster Kidney) ont été génétiquement modifiés pour produire du CNTF humain, puis encapsulés et implantés dans le striatum de primates non-humains, dans lesquels la MH a été modélisée par injections de 3-NPA (Mittoux *et al.*, 2000). La chirurgie a été bien tolérée et a permis une neuroprotection ainsi qu'une amélioration des symptômes moteurs et cognitifs. Une étude clinique de phase I a été réalisée selon ce procédé : il ne montre pas de toxicité, mais le protocole nécessite des optimisations car certaines capsules n'ont pas délivré suffisamment de CNTF (Bachoud-Lévi *et al.*, 2000b ; Bloch *et al.*, 2004).

#### b. Les protéines chaperonnes

L'utilisation de molécules chaperonnes peut avoir deux intérêts : le premier est d'intervenir dans le repliement des molécules mutées, et le deuxième est relatif à un mécanisme appelé autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) (Kaushik et Cuervo, 2012).

La première utilisation se base sur le fait que certaines protéines chaperonnes, comme Hsp104, ont la capacité de restructurer des protéines avec un repliement incorrect. La surexpression de hsp104 et hsp27 à l'aide d'un lentivirus dans un modèle de rat empêche la perte neuronale dans le striatum (Perrin *et al.*, 2007). D'autre part, cela modifie la biodistribution des agrégats puisqu'il y a une augmentation du nombre d'inclusions cytoplasmiques et une diminution des agrégats nucléaires.

Dans le but d'induire le mécanisme de CMA spécifiquement pour muHTT, un groupe japonais a mis au point une molécule de fusion contenant des motifs de liaison pour des protéines chaperonnes et pour une expansion de polyglutamine (Bauer *et al.*, 2010). Après injections intrastriatales d'AAV recombinants codant pour cette protéine de fusion, cette équipe a montré une augmentation de la dégradation de muHTT par le CMA ainsi qu'un allongement de la durée de vie des souris R6/2 accompagné d'une amélioration du phénotype.



### c. PA28γ, un activateur du protéasome

Récemment, une équipe coréenne s'est intéressée à un activateur du protéasome : PA28γ. L'injection d'un lentivirus permettant l'expression de cette protéine dans le striatum de souris YAC128 a montré une augmentation de l'activité du protéasome, une amélioration des troubles moteurs et une correction des déficits en BDNF (Jeon *et al.*, 2016).

### d. Le cholestérol

La dérégulation du métabolisme du cholestérol est une caractéristique des maladies neurodégénératives en général. En effet, l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol est souvent impactée (Boussicault *et al.*, 2016). En particulier, le niveau d'expression de l'enzyme CYP46A1 est diminué dans le striatum des patients et des modèles murins MH. L'injection d'AAV2/rh10-CYP46A1 dans le striatum des souris R6/2 a pour conséquence de rétablir les niveaux de cholestérol et autres métabolites de sa voie de biosynthèse. De plus, les déficits moteurs ainsi que l'atrophie du striatum sont améliorés par cette stratégie.

## 3. Les approches de genome editing

### a. Les protéines à doigt de zinc

Les protéines à doigt de zinc (ZFP pour Zinc Finger Protein) sont capables de se lier à l'ADN et sont à l'origine impliquées dans la régulation de la transcription de certains gènes. Des chercheurs ont utilisé cette propriété et ont modifié le site de liaison à l'ADN pour que les ZFP soient capables de reconnaître les répétitions CAG (Garriga-Canut *et al.*, 2012). Ainsi, en injectant dans le striatum de souris R6/2 un AAV2/1 pour exprimer une ZFP modifiée, ils montrent une répression de l'expression de HTT conduisant à une réduction des agrégats protéiques ainsi qu'à une amélioration des symptômes de la MH.

### b. Le système CRISPR/Cas9

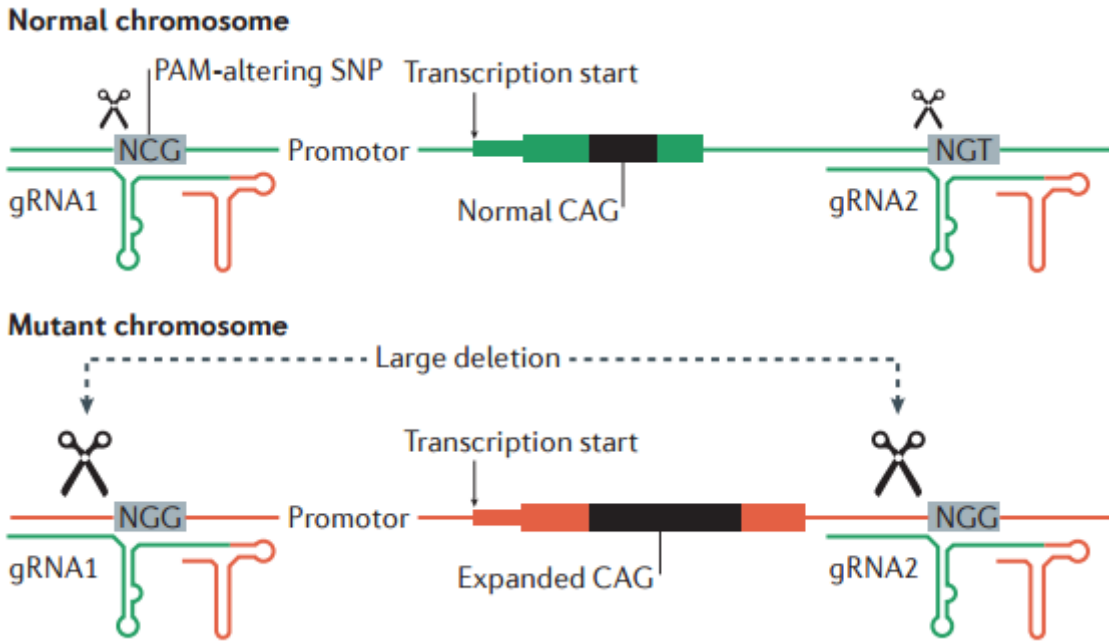
La découverte récente du système CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 a permis d'éditer de nombreux gènes, et *HTT* ne déroge pas à la règle. Ce procédé nécessite la co-expression d'un guide d'ARN (gRNA) et d'une endonucléase à ADN nommée Cas9 (Hsu *et al.*, 2014). Le gRNA est dessiné afin de cibler le gène d'intérêt en amont d'un motif PAM (Protospacer-Adjacent Motif) ce qui va permettre le recrutement

de l'enzyme Cas9 qui va alors induire une coupure de l'ADN. Cette coupure peut ensuite être réparée par deux mécanismes distincts : soit par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), soit par recombinaison homologue (HR).

Un groupe américain a utilisé un lentivirus permettant l'expression du système CRISPR/Cas9 dans des MSC provenant de souris YAC128 (Kolli *et al.*, 2017). Les chercheurs ont introduit deux gRNA ciblant de part et d'autre des répétitions CAG du gène *HTT*, ce qui a eu pour conséquence de diminuer très fortement l'expression de muHTT.

En parallèle, un groupe chinois a supprimé de manière permanente l'expression de HTT dans le striatum de souris CAG140KI (Yang *et al.*, 2017) en utilisant un AAV porteur du système CRISPR/Cas9. La réduction de HTT dans les cellules neuronales du striatum réduit les troubles moteurs et les symptômes neurologiques. Cependant, cette technologie est non spécifique, et ne permettrait pas de distinguer l'allèle muté de l'allèle sauvage dans des cellules humaines. Dans cette étude, les chercheurs montrent que la déplétion de HTT chez la souris adulte homozygote CAG140KI n'est pas délétère (Yang *et al.*, 2017).

Plusieurs études montrent aussi l'inactivation allèle-spécifique du gène *HTT*, en ciblant un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui va altérer un motif PAM dont la séquence nucléotidique est NGG. Comme représenté sur la **figure 11**, les gRNA vont se fixer de part et d'autre des répétitions CAG, et la Cas9 va couper l'ADN où le motif PAM est correctement établi, à savoir sur le chromosome contenant le gène *HTT* muté (Malkki, 2016 ; Monteys *et al.*, 2017 ; Shin *et al.*, 2016). Cela conduit à une NHEJ avec une très grande délétion de l'exon 1, et donc à une diminution de l'expression de muHTT. Des injections de rAAV2/1 dans le striatum des souris BACHD permettant l'expression des gRNA et de l'enzyme Cas9 démontrent également l'efficacité de ce système *in vivo* (Monteys *et al.*, 2017).



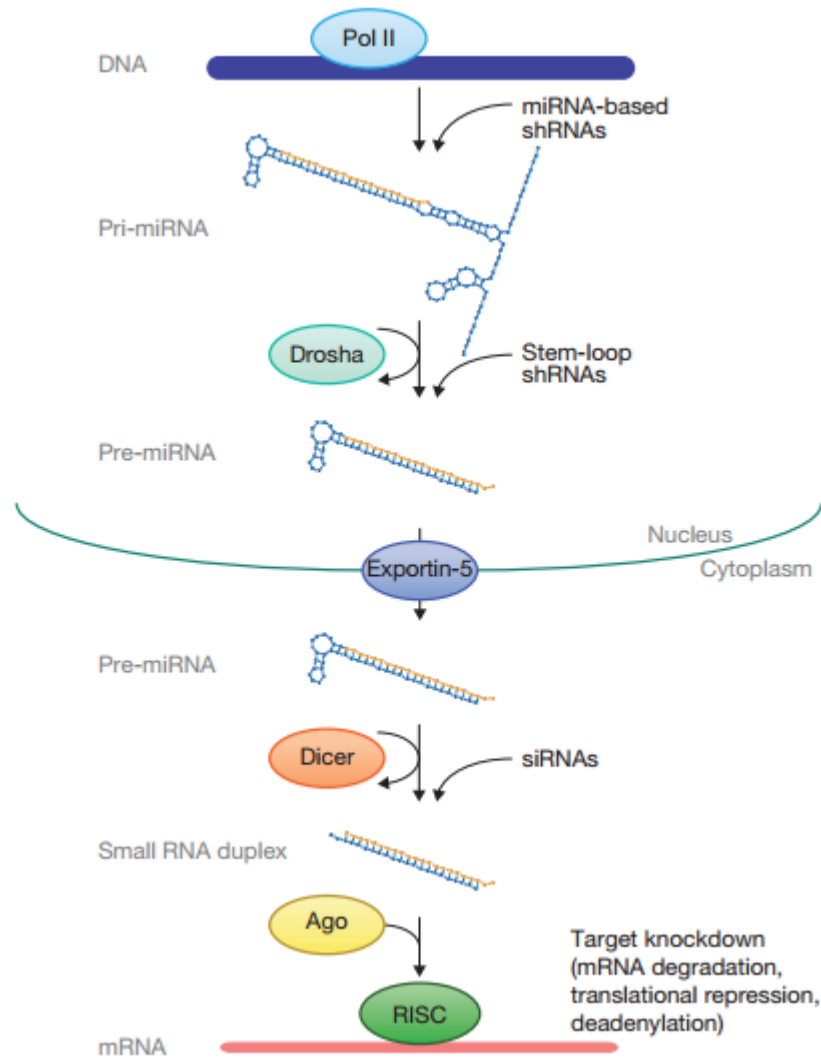
**Figure 11 : Représentation d’une approche CRISPR-Cas9 permettant une délétion spécifique du gène muté.**

PAM : protospacer adjacent motif ; SNP : single-nucleotide polymorphism ; gRNA : guide RNA, (Malkki, 2016).

Afin de réduire les effets *off target* susceptibles de survenir lors de l’utilisation du système CRISPR/Cas9, l’équipe du Pr. Déglon a développé une Cas9 capable de s’auto-inactiver, appelée Kamicas9 (travaux présentés lors de la conférence CHDI 2017). L’expression transitoire de cette enzyme sécurise ce système et pourrait conduire à une potentielle application pour les maladies neurodégénératives.

#### D. Le mécanisme d’ARN interférence

L’ARN interférence est un mécanisme très efficace pour diminuer l’expression d’un gène, comme schématisé dans la **figure 12**. Les micro-ARN (miRNA), qui font partie des ARN non-codants, sont transcrits sous forme de précurseurs appelés pri-miRNA. Ils sont ensuite transformés en pre-miRNA grâce à l’endonucléase Drosha, puis pris en charge par l’exportine-5 pour permettre leur sortie du noyau où ils sont clivés par l’enzyme Dicer formant ainsi un duplex de miRNA (Fellmann et Lowe, 2013). Ce duplex est ensuite incorporé dans un complexe multi-protéique baptisé RISC (RNA-induced *silencing* complexe) qui va induire sa dissociation. L’un des brins du duplex de miRNA sert alors de guide pour se lier à l’ARN cible et induit ainsi sa dégradation ou le blocage de sa traduction.



**Figure 12 : Schéma du mécanisme d'ARN interférence et des outils nécessaires pour induire la diminution de l'expression d'un gène.**

La machinerie peut être utilisée à différents endroits, par l'introduction de shRNA, siRNA ou miRNA, (Fellmann et Lowe, 2013).

Une des approches thérapeutiques pour diminuer l'expression d'un gène consiste à utiliser des siRNA synthétiques, ou à reproduire plus fidèlement la biosynthèse des miRNA en utilisant des shRNA (small hairpin RNA). Ces molécules sont délivrées soit grâce à des vecteurs viraux, permettant une expression constante et durable des miRNA et shRNA (Fellmann et Lowe, 2013), soit grâce à des agents transfectants pour les siRNA synthétiques. Dans le cadre de la MH, le but est de diminuer l'expression de la huntingtine selon trois grandes stratégies détaillées ci-dessous : une diminution globale, appelée allèle non spécifique, ou une diminution spécifique de l'allèle muté en ciblant soit les répétitions CAG, soit les polymorphismes (SNP, pour Single-Nucleotide Polymorphism).

### 1. Diminution du gène de manière allèle non spécifique

Après avoir établi la preuve de principe de l'efficacité d'un siRNA ciblant l'exon 1 du gène *HTT* *in vitro* (Liu *et al.*, 2003), cette molécule a été injectée par voie intracérébroventriculaire (ICV), avec un agent transfectant de type lipofectamine, dans des souris R6/2 qui montrent alors une diminution des inclusions nucléaires ainsi qu'un allongement de la durée de vie (Wang *et al.*, 2005). Les siRNA peuvent aussi être conjugués à du cholestérol afin d'améliorer l'entrée dans les neurones (DiFiglia *et al.*, 2007).

En utilisant un AAV2/1 permettant l'expression d'un shRNA ciblant l'exon 2 de *HTT*, et en l'injectant dans le striatum des souris N171-82Q, les chercheurs ont constaté une amélioration des problèmes moteurs (Harper *et al.*, 2005). De manière intéressante, certains shRNA se sont révélés toxiques pour les neurones du striatum, même lorsqu'ils n'ont aucun effet sur *HTT*. Cependant, lorsque la même séquence est exprimée sous-forme de miRNA, la toxicité n'est plus visible (McBride *et al.*, 2008). Cette stratégie a été validée par une autre équipe qui a utilisé un AAV2/5 afin d'exprimer un shRNA ciblant la région 5'UTR du transgène *HTT* chez la souris R6/1. La réduction des inclusions intranucléaires de muHTT entraîne un retard de l'apparition du phénotype de la MH chez ces souris (Rodriguez-Lebron *et al.*, 2005). L'effet neuroprotecteur de cet AAV a également été montré dans un modèle de rat (Franich *et al.*, 2008). Dans ces études, les modèles utilisés sont des animaux transgéniques qui possèdent également les 2 allèles *Hdh* murins endogènes. Les chercheurs ont donc également cherché à diminuer l'expression de *Hdh* murin, afin de savoir si la stratégie allèle non spécifique visant à diminuer également la huntingtine sauvage n'a pas de conséquence délétère sur l'organisme. Ainsi, une étude a utilisé un vecteur lentiviral pour exprimer différents shRNA ciblant à la fois le transcrite *HTT* humain et murin, et montre qu'une diminution partielle de *HTT* sauvage semble bien tolérée, même si cela altère différentes voies de signalisation associées avec la fonction de la huntingtine (Drouet *et al.*, 2009). A l'aide d'un AAV2/1-miRNA, une autre étude confirme la tolérabilité du cerveau face à une diminution de 75% du niveau de *HTT* sauvage pendant quelques mois (Boudreau *et al.*, 2009).

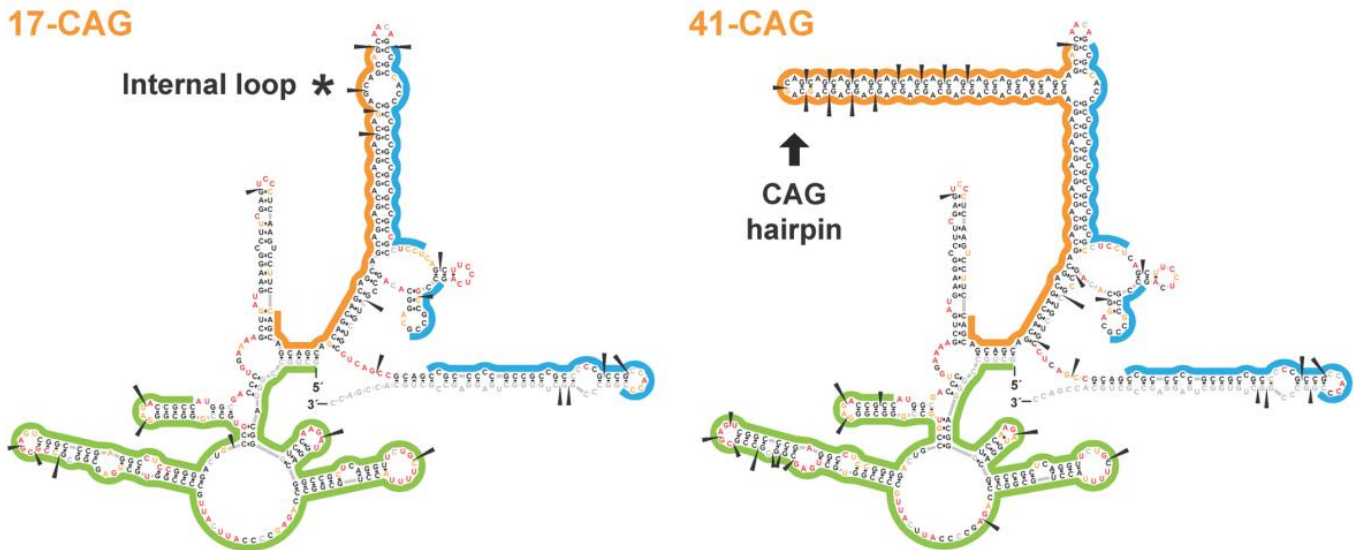
## 2. Diminution du gène de manière allèle spécifique

### a. En ciblant les SNP

Etant donné qu'une base non-appariée est suffisante pour bloquer la machinerie RISC et donc la dégradation de l'ARNm qui en découle, il est possible d'utiliser des siRNA qui peuvent discriminer l'allèle muté de l'allèle sauvage. En effet, si le siRNA cible une région contenant un SNP, le clivage de l'ARNm va avoir lieu uniquement pour l'allèle contenant la base complémentaire au siRNA, alors que l'autre allèle va peu ou pas être impacté (Bilsen *et al.*, 2008 ; Lombardi *et al.*, 2009 ; Schwarz *et al.*, 2006). Puisque de nombreux SNP sont associés avec la MH, différentes équipes ont utilisé des siRNA pour induire une diminution spécifique de l'allèle muté.

### b. En ciblant les répétitions CAG

Les chercheurs essaient d'adapter la technologie d'ARN interférence pour cibler les répétitions CAG. Compte tenu de la taille des shRNA ou siRNA, de 19 à 23 nucléotides en général, il semblerait difficile que ces molécules soient capables de différencier l'allèle muté de l'allèle sauvage. Cependant, différentes études ont montré que les structures secondaires sont différentes en fonction de la longueur de la queue polyglutamine (Busan et Weeks, 2013). De plus, la région 5'UTR en amont ainsi que la région codant pour les répétitions de proline (principalement des CCG) en aval des répétitions CAG forment dans l'ensemble une structure complexe représentée dans la **figure 13**. Ainsi, il est possible de tirer profit de ces différences structurelles. De manière intéressante, les siRNA « standards » qui vont reconnaître les répétitions CAG entraînent une dégradation de l'ARNm *HTT* via la machinerie RISC, sans sélectivité. Cependant, l'ajout de base(s) non-appariée(s) au sein du siRNA induit une très forte sélectivité en diminuant uniquement la huntingtine mutée (Fischer *et al.*, 2011, 2013 ; Hu *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2012). Il semblerait que ces siRNA avec mutation aient un mécanisme différent puisqu'ils n'entraînent pas de diminution de l'ARNm *HTT*. Il est très probable que ces siRNA soient capables de bloquer la traduction, étant donné que les répétitions CAG sont situées à seulement 51 nucléotides du site de début de traduction (Zhang et Friedlander, 2011).



**Figure 13 : Représentation de la structure secondaire des transcrits *HTT* sauvage (17 répétitions CAG) et muté (41CAG).**

En vert : la région 5'UTR, en orange : les répétitions CAG, en bleu : les répétitions CCN, (Busan et Weeks, 2013).

### E. Les oligonucléotides antisens

Il est également possible de réguler l'expression d'un gène en utilisant des oligonucléotides antisens (ASO). Ces stratégies antisens appliquées à la maladie de Huntington font l'objet de ma thèse, et vont être particulièrement développées dans la partie suivante.

### III. Les stratégies antisens comme outils thérapeutiques

#### A. Les oligonucléotides antisens

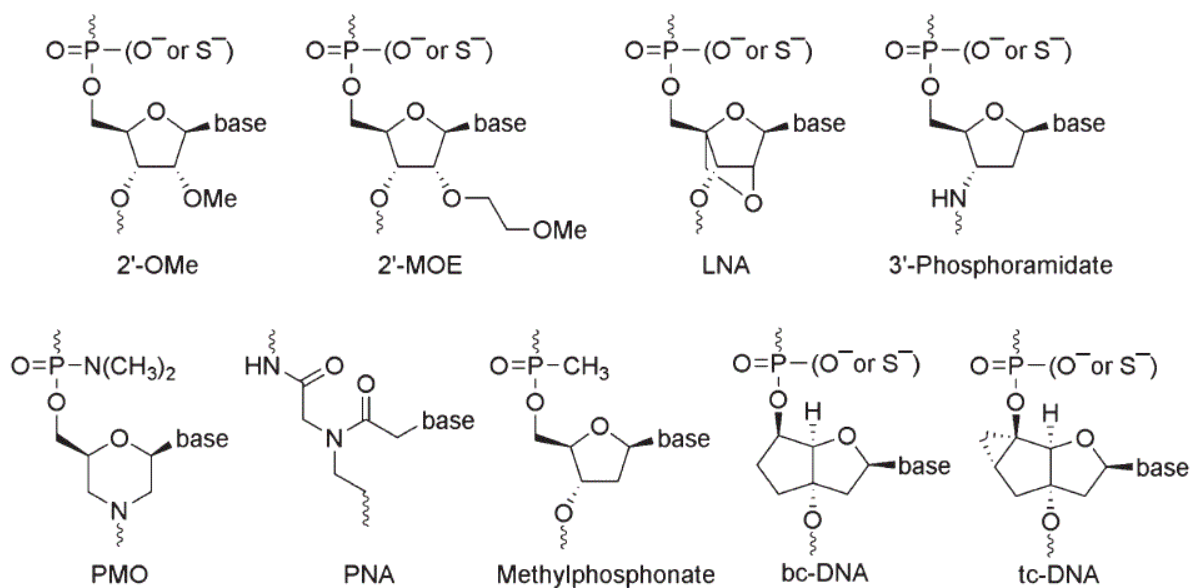
Les oligonucléotides antisens sont des enchaînements de nucléotides simples brins, de type ADN ou ARN, généralement de 12 à 22 bases, qui se lient à un ARN cible afin d'en moduler l'expression. Une première preuve de principe, établie à la fin des années 1970, a démontré leur capacité à diminuer l'expression d'un gène en inhibant la traduction (Stephenson et Zamecnik, 1978). De nombreuses autres applications ont depuis été développées, notamment grâce aux optimisations réalisées consistant à protéger davantage l'ASO tout en améliorant son hybridation à sa cible.

##### 1. Modifications chimiques

Les oligonucléotides de type ADN ou ARN étant rapidement dégradés par des endo- et des exonucléases, des modifications chimiques ont dû être apportées, comme le remplacement des liaisons phosphodiester (PO) des nucléotides par des liaisons phosphorothioates (PS). Cette modification permet en effet de diminuer leur dégradation par des nucléases (Potter *et al.*, 1983) et ainsi d'augmenter leur durée de vie de 9 heures dans du sérum, au lieu de 30 minutes pour les oligonucléotides non modifiés (Campbell *et al.*, 1990). Les PS sont en effet capables de se lier aux protéines sériques, ce qui améliore la biodistribution de l'ASO, sans inhiber l'activité de la RNase H (Rifai *et al.*, 1996).

En plus des liaisons PS, les ASO peuvent subir d'autres modifications afin d'augmenter notamment leur affinité avec l'ARN cible (**Figure 14**) (Geary *et al.*, 2001; Lubini *et al.*, 1994; Peng Ho *et al.*, 1998). Par exemple, les ASO-ARN peuvent être modifiés au niveau du carbone 2' de leur ribose par ajout d'un groupement méthyle ou méthoxy-éthyle conduisant respectivement à l'obtention de 2'O-méthyle (2'OMe) et 2'O-méthoxy-éthyle (2'MOE). Ces modifications ont pour conséquence d'augmenter l'affinité des oligonucléotides pour leur ARN cible ainsi que leur résistance aux nucléases et également de réduire leur toxicité. En revanche, ces modifications ne permettent pas l'activation de la RNase H.





**Figure 14 : Structures chimiques des différents ASO.**

2'OMe : 2'OMethyl, 2'MOE : 2'OMethoxyethyl, LNA : Locked nucleic acid, PMO : phosphorodiamidate morpholino oligomer, PNA : Peptide nucleic acid, bc-DNA : Bicyclo-DNA, tc-DNA : Tricyclo-DNA, (Goyenville *et al.*, 2016).

Certaines modifications s'éloignent de la structure de base des nucléotides, comme c'est le cas du PMO (phosphorodiamidate morpholino oligomer) par exemple, qui dérive de la morpholine (Heasman, 2002). Les PMO ne sont pas chargés comme les ASO classiques de type PO ou PS, c'est pourquoi on parle de PMO « neutres » en raison de leurs liaisons phosphorodiamidates. Les PNA (Peptide nucleic acid) sont aussi neutres de par leur liaison amide. Ils sont souvent couplés à d'autres molécules, notamment à des peptides, pour améliorer leur assimilation par les cellules (Hu et Corey, 2007). D'autres modifications donnent une forme plus contrainte à la molécule, comme les LNA (pour Locked nucleic acid), bc-DNA (bicycloDNA) et TcDNA (TricycloDNA) grâce à l'introduction de cycles dans le sucre des nucléotides (Frieden *et al.*, 2003 ; Renneberg et Leumann, 2002 ; Renneberg *et al.*, 2002). Ainsi, l'hybridation aux ARN cibles est encore améliorée en comparaison des 2'OMe et 2'MOE. Dans mon projet de thèse, je me suis particulièrement intéressée aux TcDNA, utilisés depuis plusieurs années dans mon laboratoire. C'est pourquoi nous nous attarderons davantage sur cette chimie.

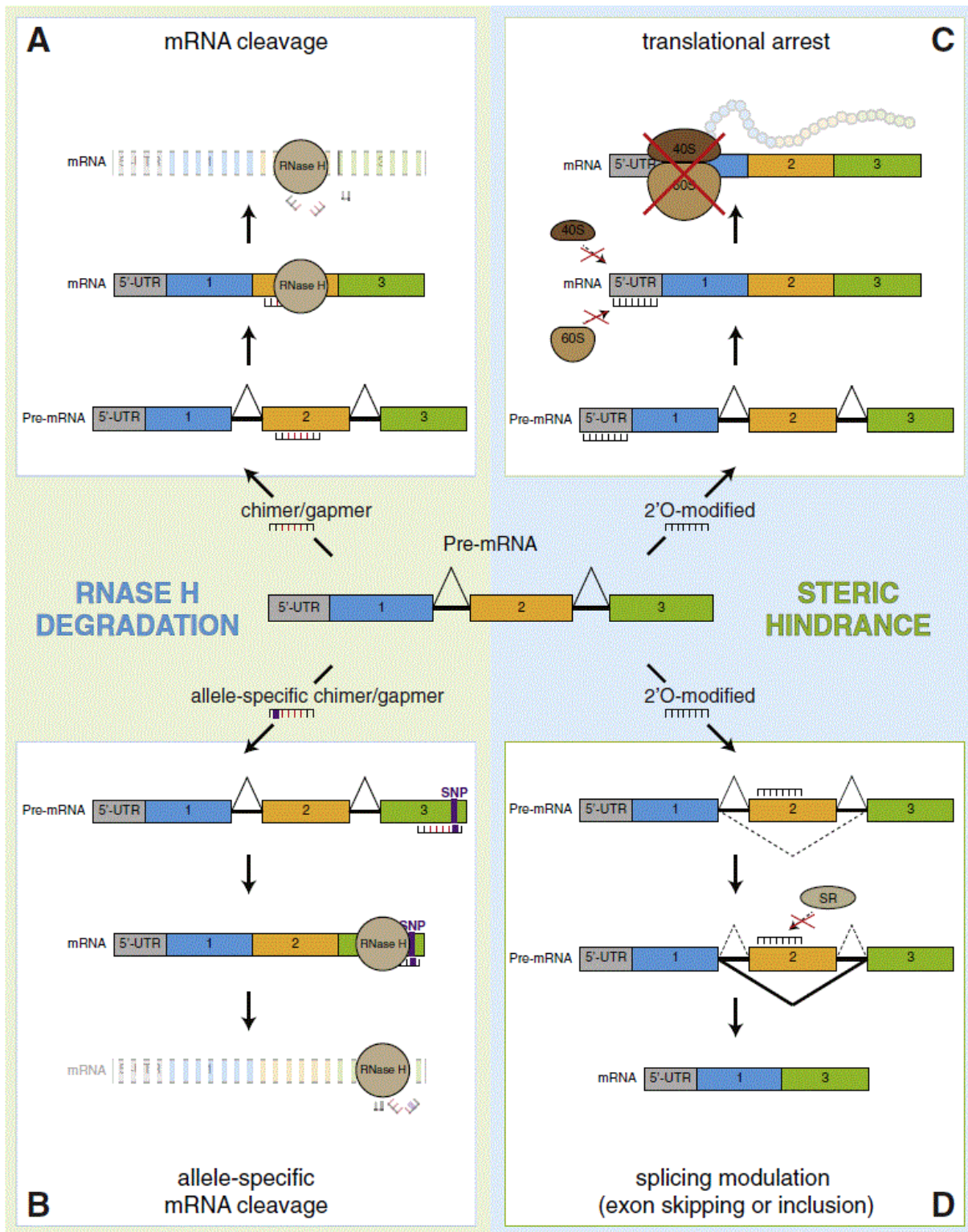
## 2. Tricyclo-DNA : un nouvel analogue nucléotidique aux propriétés prometteuses

Les TcDNA ont fait leur apparition à la fin des années 1990 (Steffens et Leumann, 1997), et font partie des analogues « contraints » de l'ADN, diminuant ainsi la flexibilité du squelette phosphate-sucre afin de préparer structurellement l'ASO à former un duplex. Cela génère donc des complexes plus stables, avec une stabilité thermique augmentée de 1,2°C par modification avec l'ADN complémentaire et de 2,4°C avec l'ARN (Renneberg et Leumann, 2002). De par leur capacité à se lier très fortement aux ARN, il est possible de diminuer la longueur des ASO. En effet, les ASO de 15 nucléotides sont aussi efficaces que ceux de 13 nucléotides (Relizani *et al.*, 2017). Tout comme les autres modifications citées précédemment, les TcDNA sont très résistants contre les nucléases et ne permettent pas l'activation de la RNase H. Cependant, ces molécules peuvent être utilisées en *gapmer*, comme nous le verrons plus tard, afin d'induire la dégradation de l'ARNm cible.

Mon équipe a démontré l'efficacité de cette nouvelle classe d'ASO dans différentes maladies neuromusculaires, comme la myopathie de Duchenne ainsi que l'amyotrophie spinale pour induire respectivement le saut ou la réinclusion d'exons (Goyenvallée *et al.*, 2015; Robin *et al.*, 2017). Ces travaux ont également prouvé leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) après injections intraveineuses et sous-cutanées. Ainsi, les TcDNA sont les seuls ASO capables de traverser la BHE, ce qui en fait une chimie de choix pour les maladies neurodégénératives, comme la MH, qui présentent également une composante systémique.

## 3. Mécanismes d'action des ASO

Les mécanismes cellulaires permettant l'entrée des ASO dans la cellule et dans le noyau restent encore mal compris (Crooke, 2017). Ces molécules sont cependant capables de réguler l'expression d'un gène selon différents mécanismes, soit par activation de la RNase H, soit par blocage stérique (**Figure 15**).



**Figure 15 : Mécanismes d'action des ASO pour moduler l'expression d'un gène.**

A. Les ASO *gapmer* activent la RNase H et induisent une dégradation de l'ARNm cible. B. Les ASO *gapmer* peuvent également cibler spécifiquement le transcrit muté, notamment grâce aux SNP. C. Les ASO peuvent aussi inhiber le mécanisme de traduction en empêchant par exemple la fixation des ribosomes. D. La liaison des ASO à des sites d'épissage peut ainsi induire un saut d'exon ou, à l'inverse, la réinclusion d'exon, (Evers *et al.*, 2015).

La RNase H est une enzyme endogène capable de reconnaître les hybrides ARN/ADN et de dégrader l'ARN (Cerritelli et Crouch, 2009). Les ASO peuvent donc activer cette enzyme pour dégrader l'ARNm cible et ainsi induire une diminution de l'expression de la protéine correspondante.

Comme décrit précédemment, les modifications apportées aux ASO, certes indispensables pour augmenter leur durée de vie, empêchent la RNase H d'agir. Ainsi, des ASO chimères, appelés *gapmer*, ont fait leur apparition (Monia *et al.*, 1993). Ils sont modifiés uniquement aux extrémités, ce qui les protègent des nucléases, mais ils contiennent en leur centre au moins cinq nucléotides non modifiés afin de permettre l'activation de la RNase H. Ces *gapmer* peuvent ainsi induire un *silencing* total de la protéine d'intérêt (**figure 15A**), ou viser uniquement la protéine mutée en ciblant un SNP par exemple (**figure 15B**) (Evers *et al.*, 2015).

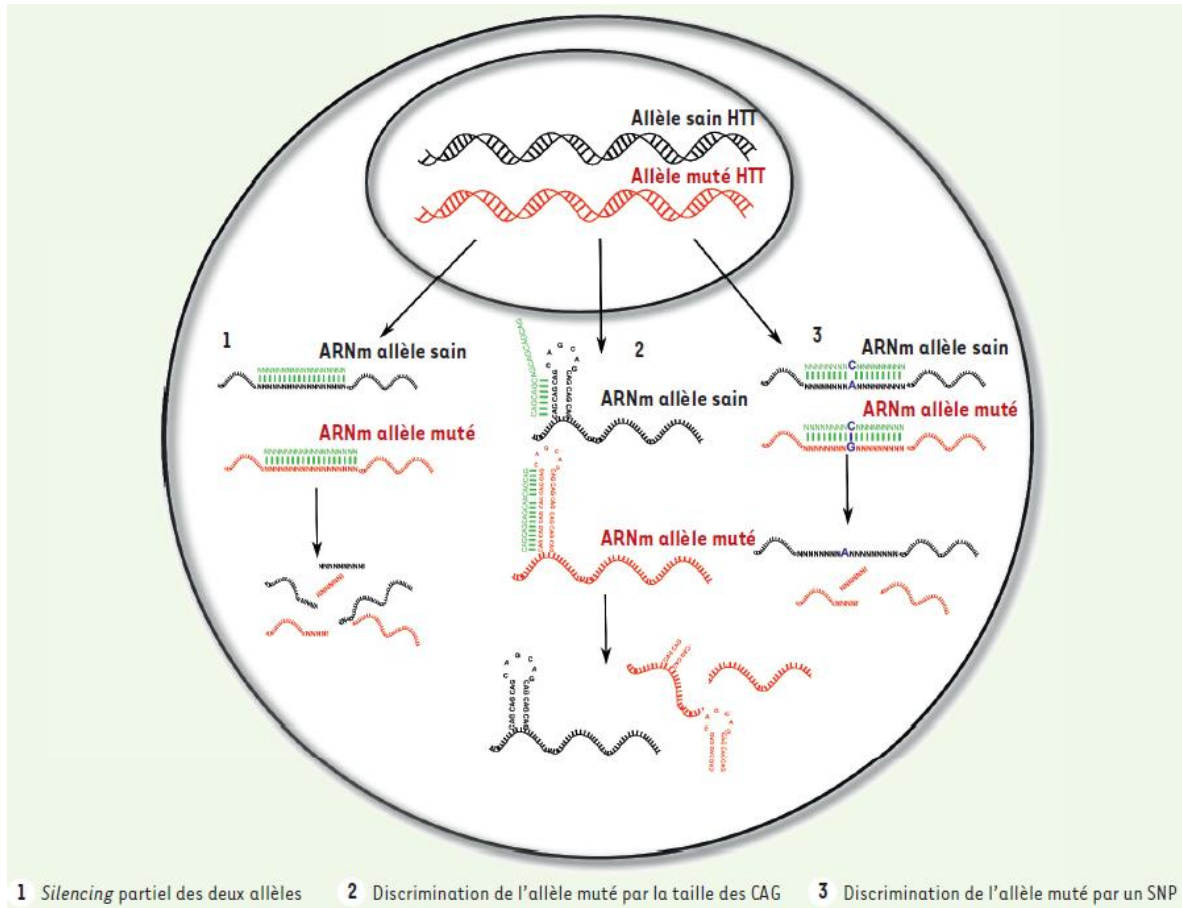
Les ASO peuvent également être utilisés pour bloquer stériquement la machinerie cellulaire. Par exemple, ils peuvent empêcher les sous-unités du ribosome de se fixer et ainsi inhiber la traduction de l'ARNm cible (**figure 15C**). Ils peuvent aussi masquer des sites importants d'épissage et ainsi moduler ce dernier (**figure 15D**). Pour ces deux derniers mécanismes, les ASO sont entièrement modifiés car ils doivent être résistants à la RNase H pour ne pas induire son activation (Evers *et al.*, 2015).

#### 4. Les ASO pour la MH

Les ASO représentent à l'heure actuelle une approche thérapeutique très prometteuse pour de nombreuses pathologies, avec différents essais cliniques en cours (Lundin *et al.*, 2015). Récemment, la FDA a d'ailleurs approuvé l'utilisation comme médicament de l'*Eteplirsén*, un PMO, pour la dystrophie musculaire de Duchenne et du *Nusinersén* (maintenant nommé *Spinraza*), un 2'MOE, pour l'amyotrophie spinale (Stein et Castanotto, 2017).

Les ASO sont d'un intérêt particulier pour les maladies neurodégénératives, dans la mesure où ils peuvent être injectés directement dans le SNC. En effet, cela empêche notamment les ASO d'être pris en charge et éliminés par le foie et les reins et augmente donc leur durée de vie dans le tissu cible (Evers *et al.*, 2015).

Dans le cadre de la MH, il est nécessaire de garder en mémoire que la plupart des patients sont hétérozygotes et possèdent donc un allèle muté et un allèle sauvage. Ainsi, les stratégies de *silencing* utilisant des ASO *gapmer* se différencient par leur spécificité vis-à-vis de l'allèle muté, comme représenté sur la **figure 16** (Merienne et Déglon, 2015).



**Figure 16 : Les approches de *silencing* dans la MH.**

1. Stratégie allèle non spécifique : l'ASO cible l'ARNm *HTT* et va induire une diminution de l'expression des deux allèles. 2. Stratégie allèle spécifique : l'ASO cible les répétitions CAG pour induire une diminution spécifique de l'allèle muté. 3. Stratégie allèle spécifique : l'ASO cible un SNP pour induire une diminution spécifique de l'allèle muté, (Merienne et Déglon, 2015).

D'autre part, des ASO entièrement modifiés peuvent être utilisés pour des stratégies de blocage de la traduction ou de régulation de l'épissage. L'ensemble de ces approches est décrit ci-dessous.

#### a. Inactivation du gène de manière allèle non spécifique

De la même façon qu'évoqué précédemment avec le mécanisme d'ARNi, l'utilisation d'ASO ciblant l'ARNm *HTT* peut induire une diminution de l'expression des deux allèles. L'entreprise américaine Isis, nouvellement renommée Ionis, a montré des résultats très

encourageants avec des 2<sup>MOE</sup> *gapmer* (Kordasiewicz *et al.*, 2012). En effet, l'infusion, à 50µg/jour pendant deux semaines, d'un ASO ciblant l'exon 36 de *HTT* humain dans le ventricule latéral droit de souris BACHD entraîne une diminution du niveau d'ARNm et de protéine HTT mutée humaine. Cette diminution persiste pendant 12 semaines, avec un retour au niveau basal à 16 semaines. Etant donné que l'ASO est spécifique de *HTT* humain, l'ARNm et la protéine HTT murins endogènes ne sont pas impactés. L'infusion dans le liquide céphalorachidien (LCR) montre une biodistribution diffuse, puisque la molécule est retrouvée dans les neurones de la plupart des régions cérébrales, comme le cortex frontal, le striatum, le thalamus et le tronc cérébral. Cette étude remarque aussi que les ASO ne s'accumulent pas seulement dans les neurones mais aussi dans des cellules non-neuronales comme les astrocytes. De manière intéressante, le *silencing* de HTT est effectif du côté ipsilatéral mais également du côté contralatéral, confirmant la diffusion efficace des ASO. De plus, la diminution de HTT est significative dans toutes les parties du cerveau, sauf dans le cervelet. Le même protocole expérimental a été réalisé chez des souris YAC128 de 3 et 6 mois, qui possèdent un phénotype plus marqué. La diminution de la huntingtine humaine est également observée. Les fonctions motrices des souris ont aussi été évaluées, notamment grâce au rotarod, un test consistant à placer la souris sur un cylindre tournant, et à mesurer le temps s'écoulant avant la chute de l'animal. Ces données nous permettent de constater que les souris traitées à l'âge de 3 mois se comportent pratiquement comme des animaux sauvages 2 mois après la fin du traitement. La réversion du phénotype est néanmoins plus difficile lorsque les souris sont traitées à un âge plus tardif (6 mois).

Des souris BACHD de 6 mois ont également été traitées de la même façon et suivies pendant 9 mois (Kordasiewicz *et al.*, 2012). Là encore, les résultats sont très prometteurs puisque 9 mois après traitement, les souris BACHD présentent une amélioration des fonctions motrices mais aussi comportementales avec une diminution de l'anxiété. Les agrégats de polyglutamine sont également diminués. Cela est d'autant plus remarquable que le niveau de muHTT est redevenu normal. Ces résultats montrent que l'effet bénéfique persiste plus longtemps que le *silencing* de la HTT.

Ces précédents résultats ont montré une diminution spécifique de muHTT humaine, et ne permettent donc pas de savoir si la suppression simultanée de HTT sauvage aurait un effet délétère. Pour répondre à cette question, les chercheurs américains ont alors utilisé un

2'MOE capable de diminuer également l'expression de HTT murine (Kordasiewicz *et al.*, 2012). Ils démontrent ainsi qu'une réduction de 75% de HTT murine pendant 3 mois, en plus de la diminution de muHTT, entraîne aussi une réversion du phénotype et n'affecte pas l'activité motrice des souris. Cela semble donc être bien toléré par l'organisme murin.

Afin de déterminer la biodistribution du 2'MOE dans un cerveau plus complexe, ils ont infusé des primates non-humains par voie intrathécale avec un 2'MOE spécifique de HTT de macaques rhésus pendant 21 jours à 4mg/jour (Kordasiewicz *et al.*, 2012). La distribution de l'ASO dans le cerveau de singe est très large puisque l'on en retrouve notamment dans le cortex, le striatum (en particulier dans les MSN), l'hippocampe, le cervelet, et la moelle épinière.

L'ensemble de ces résultats pré-cliniques informe non seulement sur la bonne tolérance de la diminution de HTT sauvage, mais également sur l'efficacité de la molécule à réverser le phénotype à long terme. D'autre part, la biodistribution diffuse de l'ASO est également un point important étant donné que la MH n'est pas une pathologie limitée au striatum.

Le 2'MOE ciblant l'exon 36 du gène *HTT* humain, appelée IONIS HTRx (ou ISIS 443139), est actuellement en essai clinique de phase I/II. Les patients qui ont reçu cette molécule par voie intrathécale ne montrent jusqu'à maintenant aucun effet secondaire lié à une potentielle toxicité.

#### b. Inactivation du gène de manière allèle spécifique

##### i. En ciblant les SNP

De la même manière que pour les approches d'ARNi, il est possible d'induire une diminution spécifique de l'allèle muté en ciblant un SNP permettant de discriminer les deux types de transcrits avec un ASO. Cependant, la machinerie d'ARN interférence n'agit que dans le cytoplasme sur l'ARNm mature : seuls les SNP présents dans les exons peuvent donc être atteints. A l'inverse, les ASO peuvent pénétrer dans le noyau et agir sur le pré-ARNm, augmentant ainsi le nombre de SNP pouvant être ciblés. Ainsi, après avoir identifié un nombre important de SNP dans le gène *HTT* humain, le groupe du Pr. Hayden a développé un 2'MOE *gapmer* ciblant un SNP présent chez 49% de la population atteinte par la MH (Carroll *et al.*, 2011). Cette molécule a démontré son efficacité *in vitro* dans des neurones et

*in vivo* après injections intrastriatales dans la souris BACHD en diminuant uniquement le niveau protéique de muHTT. Différentes études ont ensuite cherché à améliorer l'efficacité et la sélectivité de ces séquences, notamment en réduisant le nombre de nucléotides non-modifiés à l'intérieur de l'ASO, en positionnant de manière stratégique le SNP, et également en ajoutant d'autres modifications comme le « S-constrained ethyl » (cEt) (Østergaard *et al.*, 2013 ; Skotte *et al.*, 2014). L'incorporation de cette modification (nouvelle génération d'ASO développée par IONIS) augmente significativement la durée de vie de la molécule. En effet, 16 semaines après une injection ICV de 300µg de 2'MOE (ancienne génération) dans les souris humanisées Hu97/18, le niveau protéique de muHTT revient à un niveau basal alors qu'après une injection de l'ASO-cEt (nouvelle génération), le niveau protéique est encore réduit 36 semaines après. La biodistribution est similaire à ce qui avait été précédemment décrit pour les ASO, à savoir qu'après une injection ICV, l'ensemble du cerveau contient la molécule. En conséquence, le *silencing* de muHTT est visible dans toutes les structures, mais dans une moindre mesure dans le cervelet. Des études de doses ont également été réalisées et montrent qu'une faible quantité de 25µg suffit à diminuer significativement le niveau d'ARNm et de protéine muHTT chez Hu97/18. De plus, la plus forte dose (500µg) n'a pas induit de signes particuliers de neuroinflammation, attestant de la bonne tolérance de cette molécule (Southwell *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve que cette stratégie est efficace et spécifique de l'allèle muté, ce qui présente un fort avantage pour la translation de cette approche en clinique. Cependant, bien que de nombreux SNP aient été détectés chez les patients, aucun n'a été retrouvé en commun dans l'ensemble de cette population (Kay *et al.*, 2015). Il faudrait alors cibler 3 SNP différents, avec 3 ASO différents, pour pouvoir traiter environ 80% des personnes atteintes de la MH. Il s'agit par conséquent d'une approche de médecine personnalisée nécessitant de génotyper les patients afin d'utiliser une molécule appropriée (Kay *et al.*, 2014b).

#### ii. En ciblant les répétitions CAG

Comme nous l'avons précédemment expliqué dans la partie ARN interférence, les différences de nombre de répétitions CAG entre l'allèle muté et l'allèle sauvage peuvent permettre de les discriminer. L'équipe du Pr. Corey a utilisé des PNA conjugués à différents peptides ainsi que des LNA (Hu *et al.*, 2009b, 2009a). Ces molécules ciblent les répétitions



CAG, mais également les jonctions 5' et 3' des répétitions afin d'augmenter la spécificité pour les transcrits *HTT*. A l'exception de la molécule ciblant la jonction 5', les ASO (1 $\mu$ M) induisent une diminution spécifique de muHTT lorsqu'ils sont mis en contact avec une lignée de fibroblastes provenant de patients MH (17/69 CAG) sans agent transfectant. Le niveau de l'ARNm *HTT* n'est pas impacté, ce qui est cohérent avec un mécanisme d'inhibition de la traduction. D'autre part, le PNA ciblant les répétitions ne semble pas modifier l'expression de différentes protéines issues de gènes contenant également des CAG, comme TBP (TATA box binding protein, 19 CAG), ATN1 (atrophin-1, 15 CAG) et FOXP2 (forkhead box protein P2, 40 CAG-CAA). Sur des MSN provenant de YAC128, l'ajout de ce PNA est neuroprotecteur contre la toxicité induite par le glutamate. Différentes modifications chimiques et combinaisons, réalisées pour augmenter la spécificité, ont été testées *in vitro* (Gagnon *et al.*, 2010). Cette stratégie peut également être utilisée pour d'autres maladies par expansion de polyglutamine, comme pour l'ataxie spinocérébelleuse (Hu *et al.*, 2011). L'équipe du Pr. Corey confirme donc que la liaison des ASO avec les ARNm induit un blocage de la traduction sans impacter les niveaux de transcrits (Gagnon *et al.*, 2010).

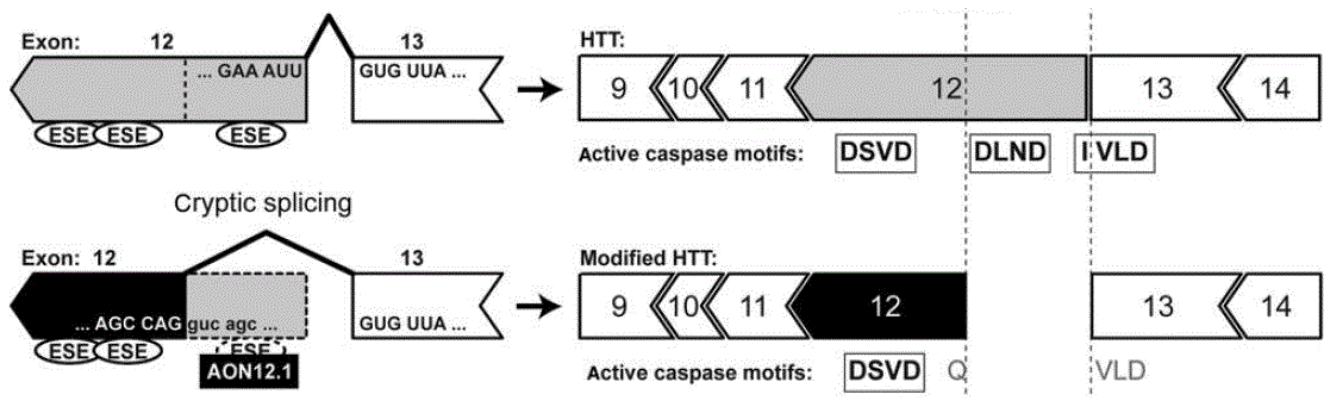
Une autre équipe s'est intéressée à l'usage des PMO pour cibler les répétitions CAG. Cette chimie a déjà fait ses preuves pour la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), et a également montré de bons résultats pour la dystrophie myotonique de Steinert (DM1) (Wheeler *et al.*, 2009). Le potentiel des PMO a donc également été testé pour la MH, en ciblant les répétitions CAG et les régions voisines (Sun *et al.*, 2014). Ces molécules sont capables de diminuer spécifiquement le niveau de muHTT dans des lignées de fibroblastes dérivés de patients mais aussi dans 2 modèles murins après injections ICV de 100 $\mu$ g de PMO-CTG25 ou CTG28. Il est intéressant de noter que le PMO-CTG22, le plus court, inhibe totalement l'expression protéique de HTT, de manière allèle non spécifique. Cette équipe ne montre également pas de diminution des transcrits *HTT* et confirme donc l'hypothèse d'un blocage de la traduction (Sun *et al.*, 2014). A l'inverse, une équipe hollandaise utilise des 2'OMe complètement modifiés, qui n'activent donc pas la RNase H, mais entraînent une diminution du niveau de transcrits *HTT* (Evers *et al.*, 2011).

Ces études précliniques ont démontré des résultats très encourageants et confirment l'efficacité des approches de *silencing* médiée par des ASO.

c. Diminution du clivage de la protéine par saut d'exon

De nombreuses études ont rapporté l'importance de l'implication des clivages protéolytiques dans la physiopathologie de la MH (Graham *et al.*, 2006 ; Pouladi *et al.*, 2008). En effet, les fragments N-terminaux, composants principaux des agrégats, semblent plus toxiques que la forme HTT longue. Trois sites de clivage semblent particulièrement importants : les motifs de caspase 3, en position 513 et 552, et le motif caspase 6 en position 586. Des mutations au niveau de ces sites diminuent la toxicité et les agrégats *in vitro*. Il a également été montré qu'une mutation en position 586, qui entraîne une perte du site de caspase 6, reverse le phénotype de la souris YAC128, alors que les mutations en positions 513 et 552 n'ont aucun effet. Il semblerait donc que le clivage par la caspase 6 soit particulièrement important dans le processus de la MH.

Comme évoqué précédemment dans les mécanismes des ASO, ces molécules peuvent être utilisées pour moduler l'épissage, et notamment pour sauter des exons. Ainsi, une équipe hollandaise a développé des 2'OMe afin de sauter les exons 12 et 13 contenant ces 3 sites de clivage, dans le but d'obtenir une protéine, certes plus courte, mais qui ne pourra plus être clivée et générer des fragments N-terminaux toxiques (Evers *et al.*, 2014). Pour cela, les chercheurs ont dessiné différents ASO et l'un d'eux, nommé 12.1, entraîne *in vitro* un saut partiel de l'exon 12 dû à l'activation d'un site cryptique d'épissage (**figure 17**). Même si ce n'était pas le résultat attendu, cela permet tout de même d'éliminer les sites de clivage en positions 552 et 586.



**Figure 17 : Représentation des exons contenant les sites de clivage et du saut partiel de l'exon 12 obtenu avec le 2'OMe 12.1.**

ESE : exonic splicing enhancer, (Evers *et al.*, 2014).

Cette équipe a également démontré la faisabilité du saut partiel de l'exon 12 dans des souris YAC128 après 3 injections ICV hebdomadaires de 200 µg de 2'OMe 12.1 (Casaca-Carreira *et al.*, 2016). Cette étude montre également que la biodistribution est diffuse puisque l'exclusion d'exon est constatée dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le striatum, et plus faiblement dans le cervelet.

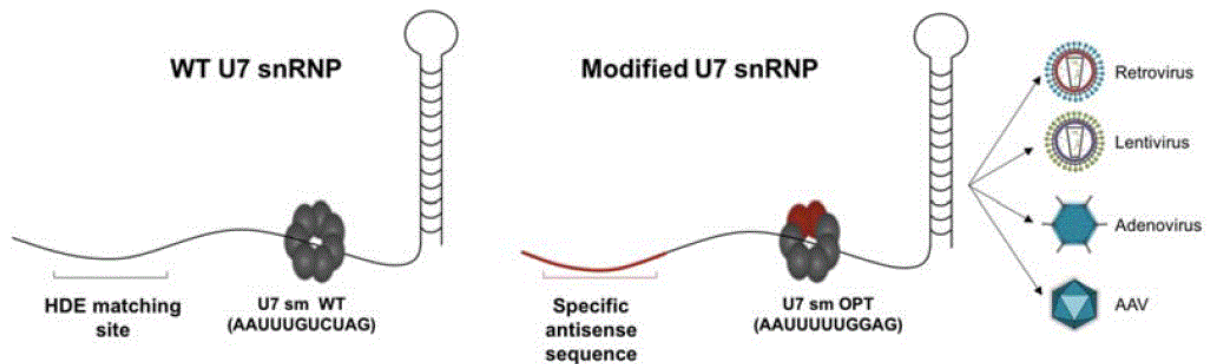
L'ensemble de ces travaux confirme le potentiel thérapeutique des ASO pour des stratégies de saut d'exon ou de *silencing*. Les effets obtenus ne semblent cependant pas perdurer dans l'organisme, ce qui nécessiterait des injections répétées tout au long de la vie du patient. Cela peut être problématique, surtout pour les maladies neurodégénératives où les injections qui visent le SNC sont relativement invasives (injections intrathécales ou ICV). C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un système vectorisé en utilisant des vecteurs viraux, afin d'exprimer la séquence antisens de manière durable et d'obtenir un effet à long terme.

## B. Un système vectorisé : le U7snRNA

### 1. Fonction physiologique des snRNA

Les snRNA (small nuclear RNA) sont de petits ARN nucléaires non-codants d'environ 150 nucléotides. Ces molécules sont impliquées dans la maturation des ARN pré-messagers et sont associées à des protéines spécifiques appelées Sm, formant ainsi un snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) (Imbert *et al.*, 2017). Nous allons nous intéresser en particulier au U7snRNA, un snRNA faiblement exprimé par rapport aux autres, ce qui est probablement dû à un site de liaison aux protéines Sm un peu différent. Ainsi, en modifiant la séquence Sm et en la remplaçant par la séquence consensus présente dans les autres snRNA, le niveau d'expression devient 4 à 5 fois plus élevé. De plus, le U7snRNA modifié s'accumule davantage dans le noyau, et perd son activité naturelle, à savoir la maturation des ARN pré-messagers codant pour les histones (Grimm *et al.*, 1993). La structure du U7snRNA est relativement simple, comme représentée sur la **figure 18**, avec un site de liaison à l'ARNm histone (séquence nommée HDE pour Histone downstream element), un site de liaison aux protéines Sm et un repliement de type tige-boucle. Il est ainsi possible de modifier la séquence HDE afin de cibler le pré-ARNm voulu pour réguler son épissage ou son expression.

Le U7snRNA peut donc servir de « navette » pour la séquence antisens qui est directement acheminée vers le noyau.



**Figure 18 : Structure d'un U7snRNP.**

Le U7snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) est un complexe formé par le U7snRNA et les protéines Sm. Le site HDE peut être modifié pour cibler un ARNm d'intérêt. HDE : Histone downstream element (Imbert *et al.*, 2017).

## 2. Utilisation des snRNA comme outil thérapeutique

Le système U7snRNA a été initialement testé dans un modèle cellulaire de  $\beta$ -thalassémie, afin de restaurer l'épissage aberrant observé sur le gène *HBB* (Gorman *et al.*, 1998). Quelques années plus tard, l'efficacité de ce système a été améliorée en introduisant, au sein d'un même U7snRNA, deux séquences antisens qui vont ainsi agir en synergie (Suter *et al.*, 1999). Cet U7snRNA dit « double cible » apporte une preuve supplémentaire de la fonctionnalité de cette approche pour corriger un défaut d'épissage et, en l'occurrence, restaurer l'expression de la  $\beta$ -globine. Le système U7snRNA a depuis été appliqué à d'autres maladies génétiques.

Parmi elles, la dystrophie musculaire de Duchenne se prête particulièrement à une stratégie de saut d'exon du fait des mutations retrouvées chez les patients qui entraînent, pour la plupart, un décalage du cadre de lecture et une absence totale de dystrophine. Un modèle murin de cette pathologie, la souris *mdx*, présente une mutation non-sens dans l'exon 23 de la dystrophine. Le travail qui a été réalisé dans mon laboratoire il y a plus d'une dizaine d'années consiste à générer un U7 « double cible » capable de reconnaître 2 sites importants pour l'épissage : le point de branchement dans l'intron 22 et le site donneur dans l'intron 23 (Goyenvallé, 2004). Cette cassette U7 a été vectorisée dans un AAV2/1 puis injectée par voie intramusculaire dans la souris *mdx*. Les chercheurs ont ainsi réussi à exclure l'exon 23 porteur de la mutation, maintenant ainsi le cadre de lecture et générant une protéine

tronquée intérieurement, mais partiellement fonctionnelle. Cette expérience a également été réalisée dans un autre modèle dystrophique plus sévère, où l'injection par voie intraveineuse d'un AAV9 porteur d'un U7snRNA a restauré l'expression de la dystrophine et augmenté la durée de vie des souris (Goyenvalle *et al.*, 2012a). En fonction des mutations, il est parfois nécessaire de sauter plusieurs exons, comme c'est le cas pour le modèle canin GRMD (golden retriever muscular dystrophy dog) qui contient une mutation au niveau de l'intron 6. Le phasage de la dystrophine oblige l'exclusion des exons 6 à 8 pour conserver le cadre de lecture et conduire à l'obtention d'une protéine tronquée mais fonctionnelle. L'utilisation d'AAV porteur de U7snRNA modifiés permet là encore une restauration durable de la dystrophine ainsi qu'une amélioration du phénotype (Bish *et al.*, 2012; Vulin *et al.*, 2012). Les U7snRNA peuvent également être utilisés pour induire une réinclusion d'exon, comme dans le cas de l'amyotrophie spinale ou de la maladie de Pompe. Ces approches ne seront pas détaillées ici mais figurent dans la revue située en annexe de ce manuscrit (Imbert *et al.*, 2017).

Plutôt que de restaurer le cadre de lecture, les U7snRNA peuvent également être utilisés pour casser le cadre de lecture en créant un codon stop prématuré et ainsi induire un *knock-down* de la protéine. Par exemple, cela a été fait avec la cyclophiline A (CyPA), protéine nécessaire pour la multiplication du VIH (Liu *et al.*, 2004). L'utilisation de U7snRNA « double cible » permet ainsi l'élimination d'un exon de CyPA, diminuant ainsi son expression et donc la multiplication du VIH.

Cette stratégie antisens n'est pas exclusivement réservée à la modulation d'épissage. Par exemple, les U7snRNA ont également été utilisés pour diminuer l'expression de transcrits toxiques, comme dans la dystrophie myotonique de type1 (DM1) qui se caractérise par une expansion de répétitions CUG au niveau 3'UTR du transcrit DMPK (myotonic dystrophy protein kinase). Cette expansion de répétitions a la capacité de se lier à MBNL1 (muscleblind-like 1), un régulateur de l'épissage, ce qui va induire des dérèglements d'épissage très importants ayant un effet délétère sur la cellule. Il a ainsi été montré que la transduction de cellules avec un lentivirus permettant l'expression d'un U7snRNA ciblant les répétitions CUG entraînait une diminution spécifique du transcrit muté, et améliorait les défauts d'épissage (François *et al.*, 2011). En effet, la fixation de la molécule U7 sur le transcrit DMPK permet la libération de MBNL1 qui peut alors jouer son rôle. Cependant, le

mécanisme selon lequel U7snRNA induit un *silencing* de DMPK est encore inconnu. Il est peu probable que cela fasse intervenir la machinerie d'ARN interférence ou la RNase H. Cependant, une des hypothèses serait que les protéines qui se fixent aux expansions de CUG permettent de stabiliser et de protéger le pré-ARNm DMPK. Ainsi, suite à la fixation du U7snRNA, les protéines ne peuvent plus protéger le transcrit muté qui se retrouve alors dégradé.

Bien que le système U7snRNA n'ait pour l'instant jamais été utilisé pour la MH, il pourrait parfaitement s'appliquer à cette pathologie en ciblant le gène *HTT*. Cette approche pourrait notamment être utilisée pour sauter les exons 12 et 13 afin de supprimer des sites de clivage au sein de la huntingtine et empêcher ainsi la formation de fragments N-terminaux toxiques. Les U7snRNA pourraient également être utilisés pour induire un saut d'exon qui casserait la phase de lecture. Cela conduirait alors à un *knock-down* allèle non spécifique de *HTT*, comme cela a été réalisé pour *CyPA*. Enfin, il serait intéressant de cibler les répétitions CAG avec un U7snRNA, comme cela a été fait dans DM1 avec les répétitions CUG, pour observer l'effet sur la huntingtine, en espérant que le U7snRNA soit capable de bloquer spécifiquement la traduction de muHTT.





# Objectifs et méthodologie





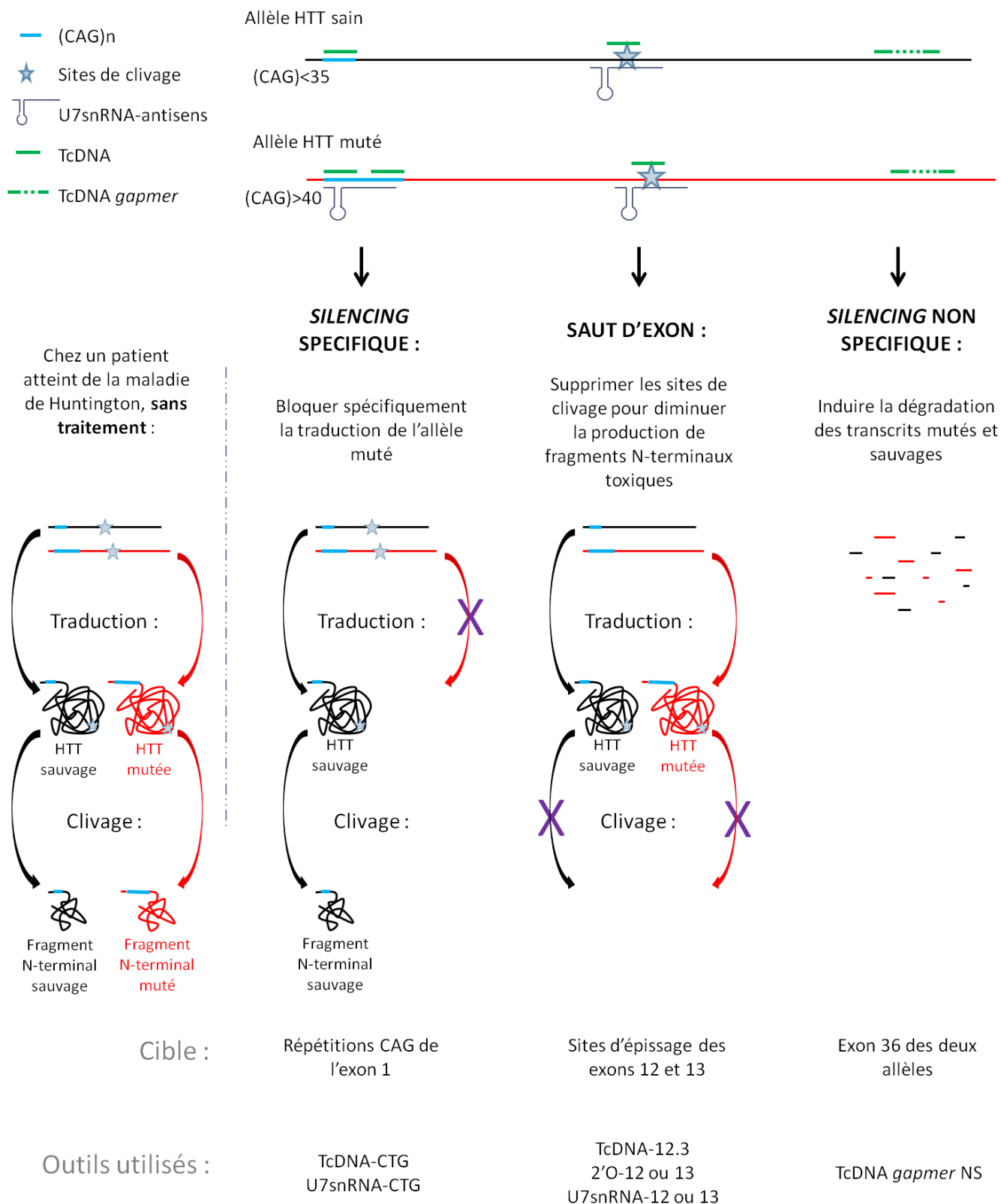
## Objectifs

Le laboratoire « Biothérapies des maladies du système neuromusculaire » dans lequel j'ai effectué mes travaux de recherche travaille essentiellement sur des approches antisens, principalement sur une nouvelle chimie d'ASO, le TcDNA, ainsi que sur une approche vectorisée utilisant le système U7snRNA. Ces deux technologies prometteuses ont fait leur preuve, notamment pour la dystrophie musculaire de Duchenne et l'amyotrophie spinale. Etant donné qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif pour la MH et que l'utilisation de stratégies antisens pour réduire l'expression de la huntingtine semble être un outil thérapeutique prometteur, l'objectif de ma thèse a été d'appliquer les outils antisens utilisés par mon laboratoire pour cette maladie neurodégénérative.

Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé d'évaluer et de comparer les trois grandes pistes thérapeutiques antisens décrites dans l'introduction, à savoir la stratégie de saut d'exon permettant d'enlever des sites de clivage à l'origine d'une forme raccourcie et toxique de HTT ; la stratégie de *silencing* allèle non spécifique, visant à diminuer de manière générale l'expression de HTT ; et enfin la stratégie de *silencing* allèle spécifique ciblant les répétitions CAG pour impacter préférentiellement l'allèle muté (**Figure 19**). Les objectifs de mon projet de thèse ont consisté à 1) mettre en place l'ensemble des outils thérapeutiques et techniques d'analyse requis, 2) évaluer et comparer *in vitro* les différentes approches citées ci-dessus et 3) sélectionner les molécules les plus prometteuses pour une évaluation *in vivo* préliminaire. Pour cela, j'ai dessiné différents TcDNA et construit différents U7snRNA porteurs de séquences antisens. Ces derniers ont été vectorisés dans des lentivirus pour permettre leur évaluation *in vitro*.

Après avoir mis au point les techniques d'analyse de l'expression de la huntingtine (RT-PCR, qPCR, WB), les différentes molécules ont été testées sur des fibroblastes dérivés de patients atteints de la MH. Ainsi, cette première évaluation a permis d'éliminer rapidement les molécules qui ne semblent pas avoir d'effet thérapeutique, et à l'inverse de sélectionner celles capables de diminuer l'expression de la huntingtine.

- Objectifs et méthodologie -



**Figure 19 : Schéma représentant les différentes stratégies antisens testées dans ce projet de recherche.**

Les U7snRNA et les TcDNA ont la capacité de se fixer aux transcrits *HTT* et de réguler l'expression de *HTT* via différents mécanismes (blocage de la traduction, saut d'exon pour diminuer le clivage, dégradation des transcrits).

Les molécules les plus prometteuses ont ainsi été choisies pour une évaluation *in vivo*, dans un modèle murin de la MH, la souris YAC128. Pour cela, les U7snRNA ont été vectorisés dans des AAV9 permettant un transfert de gènes efficace dans le cerveau. Les TcDNA et les AAV-U7snRNA ont ensuite été injectés en intracérébroventriculaire (ICV) et leur efficacité a été évaluée par RT-PCR et western blot.

L'objectif de ces travaux de recherche consiste donc à évaluer et comparer différentes approches antisens, sous forme synthétique (TcDNA) ou vectorisée (U7snRNA), pour le traitement de la maladie de Huntington.

## **Méthodologie : outils d'évaluation**

Pour les études *in vitro*, j'ai utilisé trois lignées de fibroblastes provenant de patients atteints de la maladie de Huntington avec différents nombres de répétitions CAG : GM02147 (43/15 CAG), GM03621 (59/18 CAG) et GM09197 (151/21 CAG), ainsi qu'une lignée provenant d'un individu sain : GM02171 (17/17 CAG).

Pour les études *in vivo* préliminaires, la souris YAC128 contenant le gène *HTT* humain entier avec 128 répétitions CAG a été utilisée. Les différentes molécules sélectionnées lors du *screening in vitro* ont été injectées par voie intracérébroventriculaire.

J'ai ensuite quantifié l'effet des molécules sur l'expression de la huntingtine au niveau transcriptionnel après RT-PCR classique et RT-qPCR, ainsi qu'au niveau protéique par western blot.

Les méthodes que j'ai réalisées sont décrites dans les fiches techniques présentées en annexe (construction des U7snRNA, production des vecteurs lentiviraux et AAV, transfection et transduction de fibroblastes, suivi et génotypage des souris YAC128, injection ICV, extraction d'ARN et de protéines, RT-PCR et PCR quantitative, western blot). Suite à ma formation en chirurgie sur rongeurs, j'ai participé à la mise en place des injections ICV sur souris au sein du laboratoire. Florence Blandel, ancienne ingénieure, a contribué à l'injection des souris dans le cadre de mon projet. J'ai également eu l'opportunité d'encadrer un stagiaire de M2, Marc Fournet, qui m'a assisté pour la réalisation des western blot.





# Résultats

I.	Evaluation <i>in vitro</i> des approches antisens.....	90
A.	Diminution du clivage de la protéine par saut d'exon .....	90
B.	Inactivation spécifique du gène <i>HTT</i> muté, en ciblant les répétitions CAG .....	102
C.	Inactivation allèle non spécifique du gène <i>HTT</i> .....	107
D.	Recherche de biomarqueurs <i>in vitro</i> .....	111
II.	Evaluation <i>in vivo</i> des approches antisens.....	113
A.	<i>Silencing</i> allèle spécifique, en ciblant les répétitions CAG .....	113
B.	<i>Silencing</i> allèle non spécifique.....	118



Dans un premier temps, j'ai mis en place et validé les différentes techniques d'évaluation de l'efficacité des stratégies antisens. Après reverse transcription, j'ai optimisé une PCR autour de l'exon 1, une région particulièrement difficile à amplifier à cause des répétitions CAG, qui permet une distinction entre l'allèle muté et l'allèle sauvage. Afin de confirmer les résultats obtenus par PCR classique, j'ai réalisé des PCR quantitatives pour estimer le niveau global d'ARNm *HTT*. D'autre part, afin de quantifier le niveau de protéine HTT, j'ai mis au point un protocole particulier de western blot, permettant la visualisation du doublet protéique composé des formes mutée et sauvage.

J'ai ensuite évalué les différentes molécules antisens *in vitro*, en utilisant 4 lignées de fibroblastes de patients Huntington avec différents nombres de répétitions CAG sur le gène *HTT*. L'évaluation *in vitro* des différentes approches (saut d'exon, *silencing* allèle spécifique et allèle non spécifique) et des différents outils (TcDNA et U7snRNA) est présentée dans une première partie **I**. Evaluation *in vitro* des approches antisens. Ce screening *in vitro* a permis de sélectionner les approches et les molécules les plus prometteuses pour une évaluation *in vivo* préliminaire, qui sera présentée dans une seconde partie **II**. Evaluation *in vivo* des approches antisens. Pour cela, les molécules ont été injectées en intracérébroventriculaire dans un modèle murin de la maladie de Huntington, la souris YAC128, qui contient le gène *HTT* humain entier avec 128 répétitions CAG.

## **I. Evaluation *in vitro* des approches antisens**

### **A. Diminution du clivage de la protéine par saut d'exon**

Comme décrite par Evers *et al.*, la stratégie de saut d'exon a pour but d'enlever les exons 12 et 13 du transcrit *HTT* contenant des sites de clivage afin de réduire la formation des fragments N-terminaux toxiques. Pour cela, les mises au point ont été réalisées en utilisant le 2'O-méthyl phosphorothioate décrit dans la littérature (appelé ici 2'O 12.3), ainsi que son équivalent synthétisé sous forme tricyclo-ADN (Tc 12.3). Par la suite, d'autres séquences ciblant l'exon 12 et l'exon 13 ont été dessinées.

#### **1. Utilisation d'oligonucléotides antisens synthétiques**

##### **a. Dessin des séquences antisens**

Les régions contenant le plus d'ESE dans les exons 12 et 13 ont été localisées grâce au logiciel Human Splicing Finder v3.0 (**figure 20**).



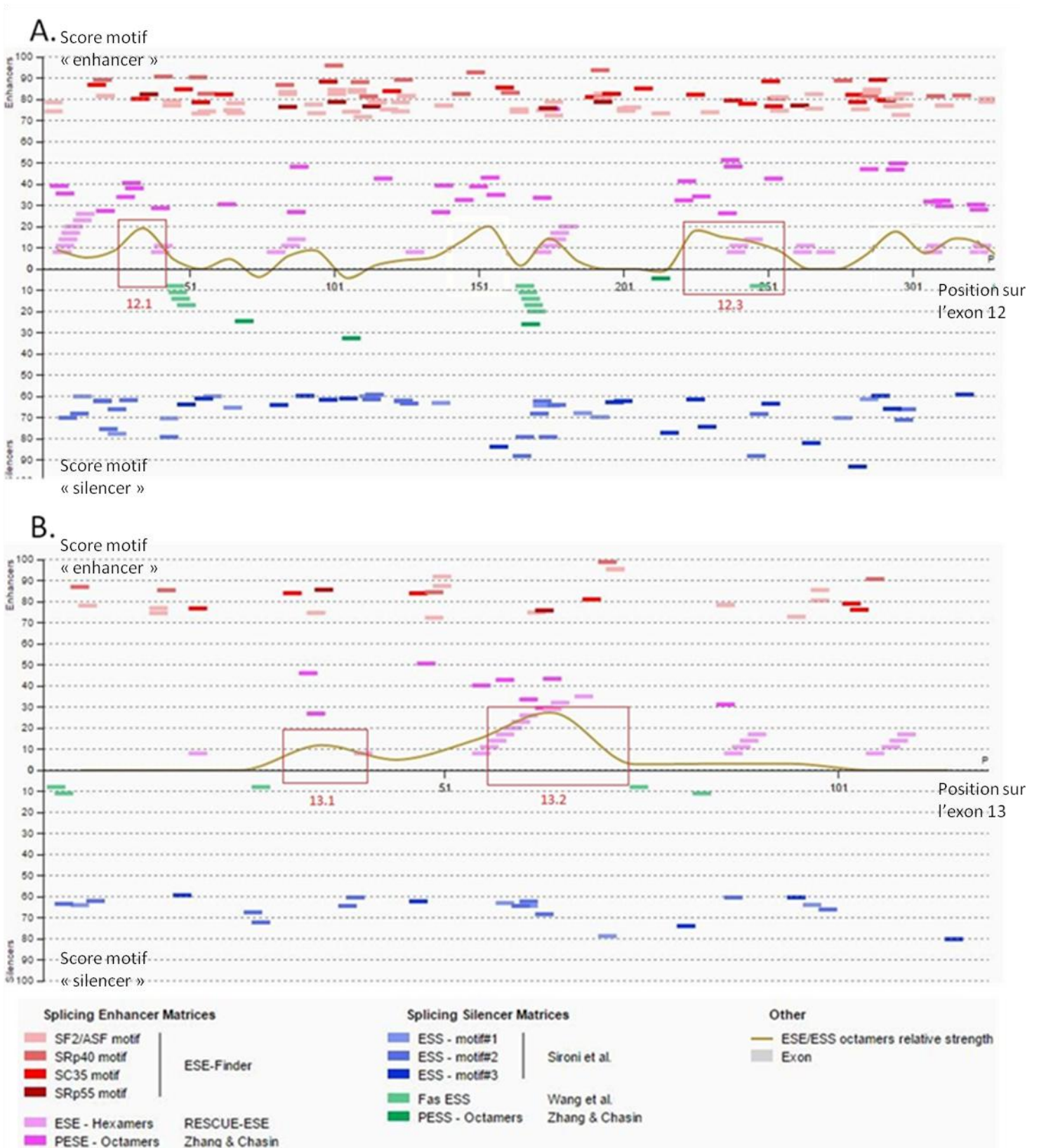


Figure 20 : Analyse de dessin des séquences antisens permettant de sauter les exons 12 et 13 afin d'enlever les sites de clivage.

Trois séquences antisens ont ainsi été dessinées dans les exons 12 et 13, en plus de la séquence 12.3 préalablement décrite. Elles sont encadrées en rouge dans la **figure 20A et 20B**. Dans un premier temps, nous avons choisi de tester sous forme 2'O-méthyl l'ensemble des séquences (2'O 12.1 ; 2'O 12.3 ; 2'O 13.1 et 2'O 13.2, **tableau III**). Seule la séquence de référence 12.3 a également été testée en TcDNA de 15 nucléotides (Tc 12.3, **tableau III**).

**Tableau III : Séquences antisens des ASO ciblant les exons 12 et 13.**

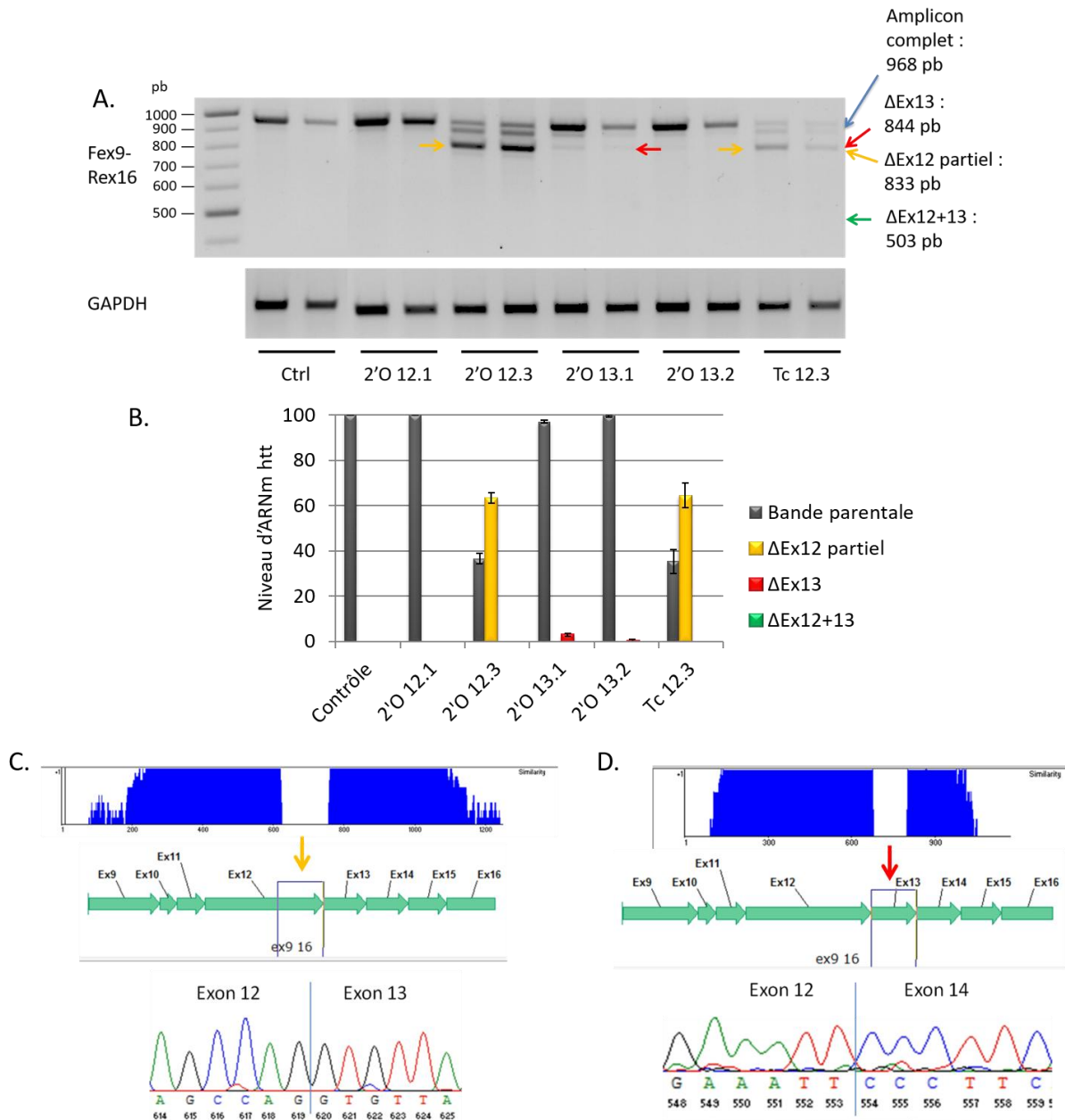
\* : Séquence commandée sous forme 2'O-méthyl-ARN. <sup>‡</sup> : Séquence commandée sous forme Tricyclo-DNA. La position de l'ASO est également indiquée : +1 est considéré comme le premier nucléotide de l'exon correspondant.

Nom de l'ASO	Séquence antisens	Position
2'O 12.1*	5'-CCUGAAGAAGCAGCCAGCUC-3'	+27/+47 exon 12
2'O 12.3*	5'-GUCCCAUCAUUCAGGUCCAU-3'	+234/+254 exon 12
Tc 12.3 <sup>‡</sup>	5'-CCATCATTGAGTCC-3'	+237/+252 exon 12
2'O 13.1*	5'-GGCUGUCCAAUCUGCAGG-3'	+33/+50 exon 13
2'O 13.2*	5'-CAGGAAGAAUACCUUGGCU-3'	+69/+89 exon 13

**b. Efficacité des oligonucléotides antisens synthétiques**

Des fibroblastes sauvages (17/17 CAG) ont été transfectés avec 3 µg de chacune des séquences antisens synthétiques à l'aide de lipofectamine (**fiche technique n°5 en annexe**). Les cellules ont été récoltées 48h après afin d'analyser le saut d'exon par RT-PCR. La **figure 21A** présente le gel d'agarose de la PCR réalisée entre les exons 9 et 16 de *HTT* afin de montrer les éventuels sauts d'exons dans cette région. Sans saut d'exon, l'intégralité du fragment amplifié mesure 968 pb, comme observé dans les conditions contrôles (flèche bleue). Les séquences 12.3 de référence montrent un saut partiel de l'exon 12 visualisé par une bande de 833 pb (flèche jaune), qui semble d'ailleurs d'efficacité similaire entre le 2'O et le Tc (**figure 21B**). La séquence 2'OMe 12.1 n'induit quant à elle aucun saut d'exon, alors que 13.1 et 13.2 entraînent l'apparition d'une très faible bande de 844 pb correspondant à un saut total de l'exon 13 (flèche rouge). Le saut total des exons 12 et 13 (bande à 503 pb, flèche verte) n'a malheureusement pas été obtenu. L'ensemble de ces résultats a été confirmé par séquençage (**figures 21C et D**). Cette expérience a été également réalisée sur les autres lignées de fibroblastes, et les mêmes résultats ont été obtenus (résultats non montrés).

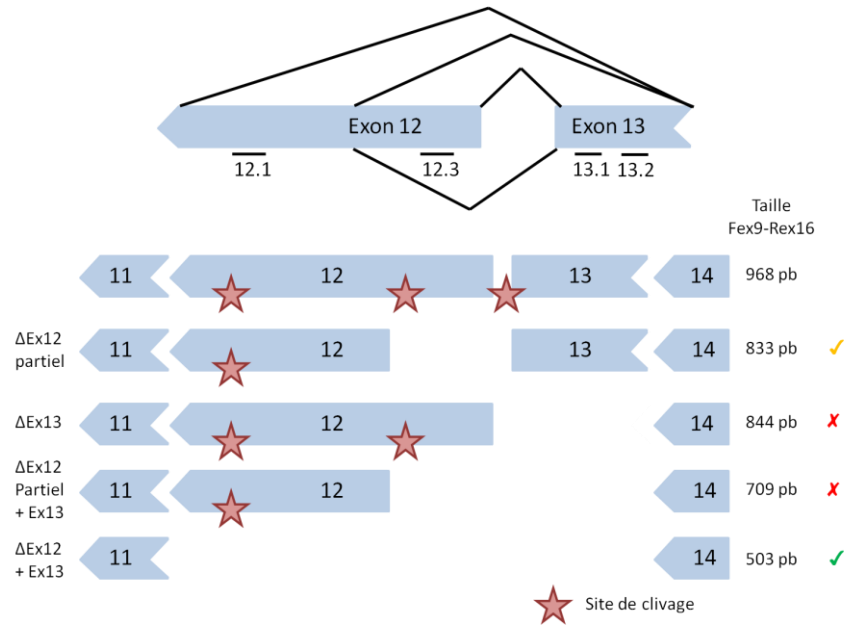
- Résultats - Evaluation *in vitro* - Approche de saut d'exon -



**Figure 21 : Efficacité de saut d'exon des ASO ciblant les exons 12 et 13 après transfection de fibroblastes sauvages GM02171 (17/17 CAG).**

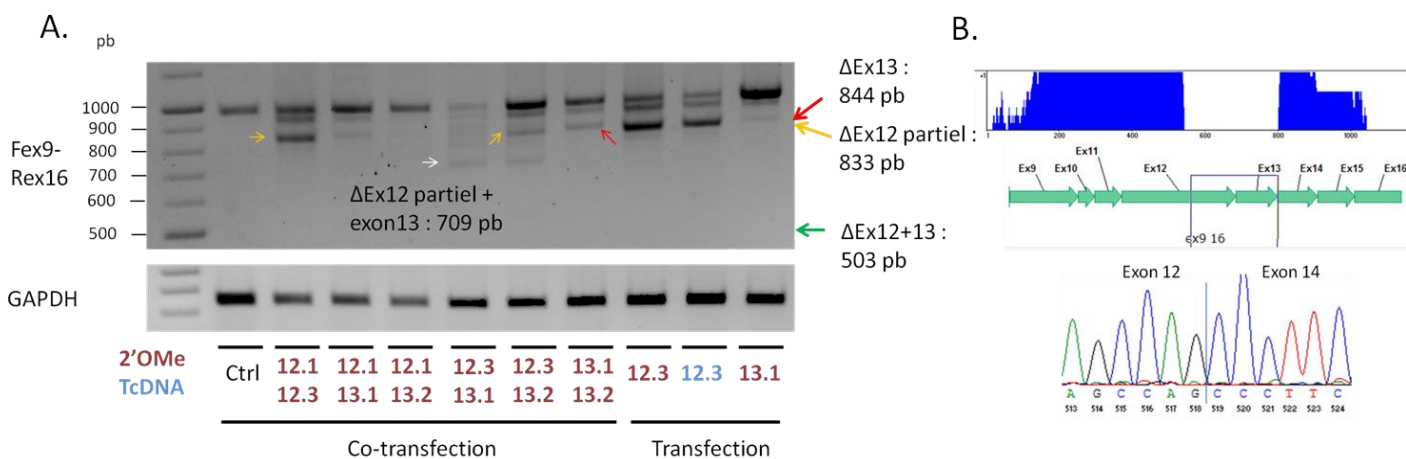
**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR amplifiant les exons 9 à 16 montrant un saut partiel de l'exon 12 (flèche orange) ; un saut de l'exon 13 (flèche rouge) ainsi que l'absence de saut total des exons 12 et 13 (flèche verte). **B.** Quantification des sauts d'exons obtenus. **C.** Séquençage de la bande indiquée par la flèche orange, indiquant le saut partiel de l'exon 12. **D.** Séquençage de la bande indiquée par la flèche rouge, indiquant le saut de l'exon 13.

Comme schématisé dans la **figure 22**, le saut partiel de l'exon 12 permet l'élimination de deux sites de clivage tout en maintenant le cadre de lecture. Cependant, l'idéal serait de sauter l'exon 12 ainsi que l'exon 13 pour rester en phase et enlever les trois sites de coupure.



**Figure 22 : Schéma représentant les différents sauts d'exons possibles.**

Afin d'obtenir un effet coopératif, des co-transfections d'oligonucléotides ont donc été réalisées. Comme on peut le voir sur la **figure 23**, ces co-transfections n'ont pas permis de détecter le saut complet des exons 12 et 13 à 503 pb comme attendu. Les résultats montrent de manière intéressante une augmentation du saut total de l'exon 13 lors de la co-transfection des séquences 13.1 et 13.2. Cependant, le saut total de l'exon 13 entraîne un décalage du cadre de lecture qui n'est pas souhaitable puisque cela ne conduira pas à l'obtention d'une protéine (rupture du cadre de lecture).



**Figure 23 : Efficacité de saut d'exon des ASO ciblant les exons 12 et 13 après co-transfection de fibroblastes sauvages GM02171 (17/17 CAG).**

**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR amplifiant les exons 9 à 16 montrant un saut partiel de l'exon 12 (flèche orange) ; le saut de l'exon 13 (flèche rouge) ; le saut partiel de l'exon 12 et total de l'exon 13 (flèche blanche) ainsi que l'absence de saut total d'exons 12 et 13 (flèche verte). **B.** Séquençage de la bande indiquée par la flèche blanche indiquant le saut partiel de l'exon 12 et total de l'exon 13.

Nous observons également l'apparition d'un autre transcrit, plus court, marqué par une flèche blanche. Le séquençage montre que ce messager est délété partiellement de l'exon 12 et totalement de l'exon 13, ce qui encore une fois n'est pas optimal puisque le cadre de lecture n'est plus en phase.

Les oligonucléotides antisens n'ayant pas permis d'obtenir un saut total des exons 12 et 13, nous avons évalué une stratégie vectorisée en utilisant le système U7snRNA, permettant de délivrer plusieurs séquences antisens grâce à un seul vecteur.

## 2. Utilisation d'une approche vectorisée

### a. Dessin des séquences antisens vectorisées

Comme décrit dans l'introduction, le système U7snRNA est utilisé pour exprimer de manière durable les antisens. Ces U7 ont démontré une très bonne efficacité lorsqu'ils sont en « double target », c'est-à-dire avec une combinaison de 2 séquences antisens, et également lorsqu'ils ciblent les sites accepteurs et donneurs d'épissage.

Nous avons donc dessiné des séquences antisens supplémentaires selon le même procédé que précédemment (**figure 24**). Les sites accepteurs (AS) et donneurs (DS) des exons 12 et 13 ont également été ciblés. Les 10 séquences antisens sont listées dans le **tableau IV**.

#### Tableau IV : Séquences antisens ciblant les exons 12 et 13.

La position de l'ASO est également indiquée : +1 est considéré comme le premier nucléotide de l'exon correspondant. Le signe - est utilisé pour les bases introniques. AS : site accepteur d'épissage, DS : site donneur d'épissage.

	Séquence antisens	Position
12.AS	5'-UUCACUGAGGCUGAAGACAG-3'	-10/+10 exon 12
12.DS	5'-CCCACUUACAAUUUCAGAAC-3'	+10/-10 exon 12
12.1	5'-CCUGAAGAAGCAGCCAGCUC-3'	+27/+47 exon 12
12.2	5'-AGCUUGUCAAGUCACAGCUG-3'	+137/+157 exon 12
12.3	5'-GUCCAUCAUUCAGGUCCAU-3'	+234/+254 exon 12
12.4	5'-GAAGGGGUAACAGCUGAAUC-3'	+306/+326 exon 12
13.AS	5'-CGUCUAACACCUAAACGGUU-3'	-10/+10 exon 13
13.DS	5'-GUCCACAUACCCAUGGAAGA-3'	+10/-10 exon 13
13.1	5'-GGCUGUCCAAUCUGCAGG-3'	+33/+50 exon 13
13.2	5'-CAGGAAGAAUACCUGUGGCU-3'	+69/+89 exon 13

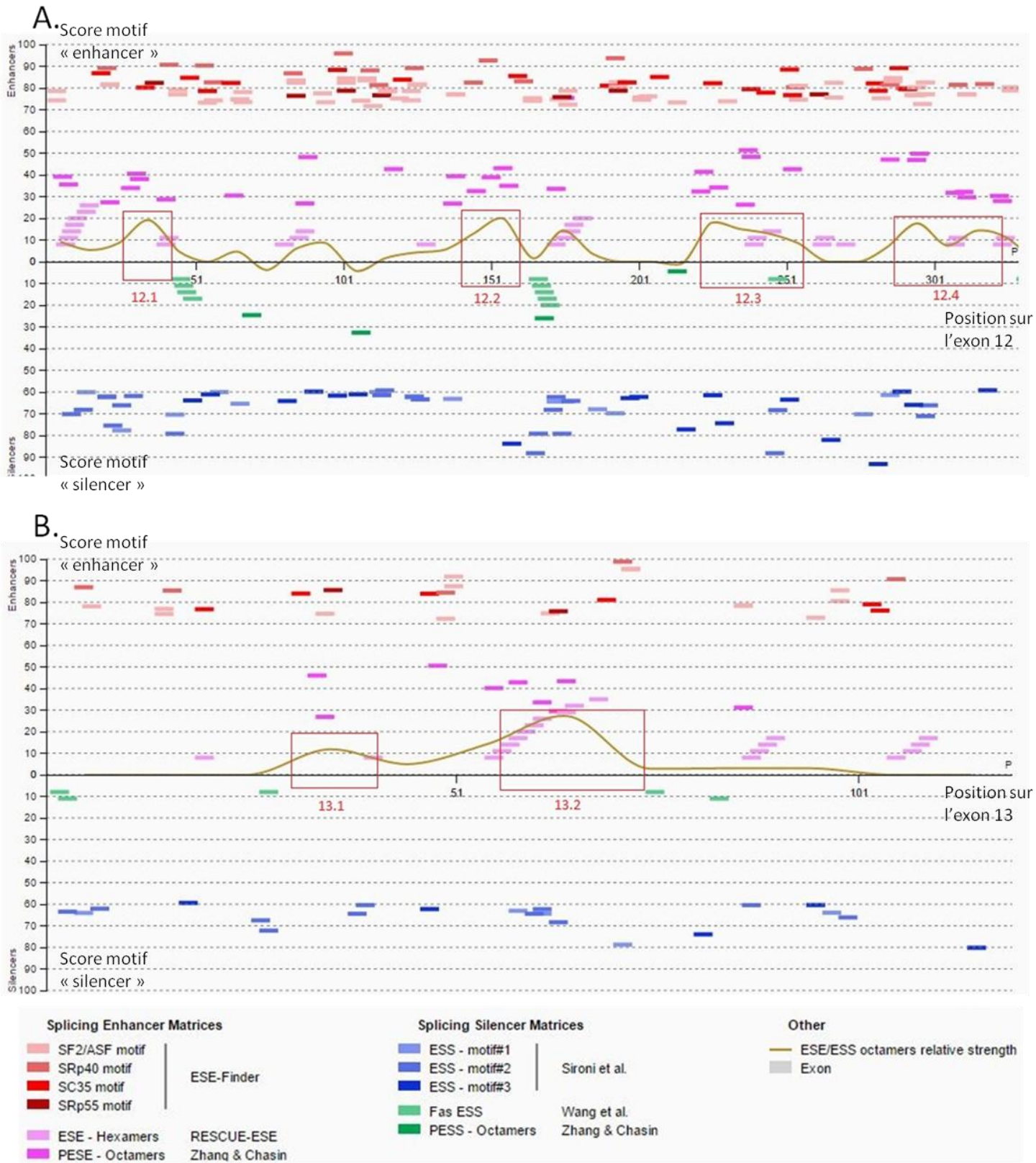
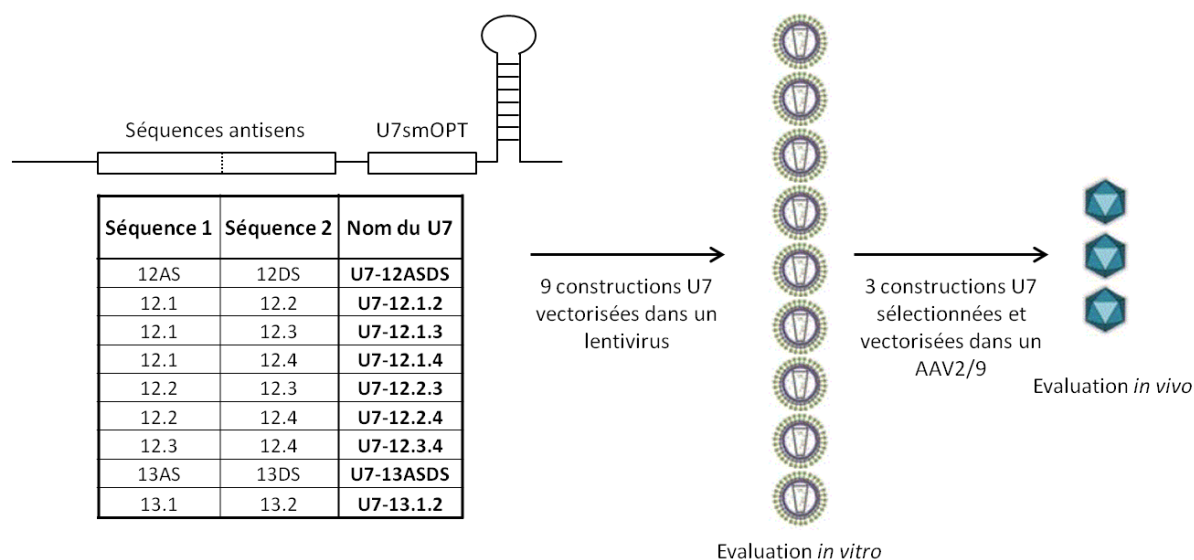


Figure 24 : Dessin des séquences antisens permettant de sauter les exons 12 et 13 afin d'enlever les sites de clivage.

Nous avons donc créé 9 cassettes U7 spécifiques des exons 12 et 13, portant soit les deux séquences ciblant les sites accepteurs et donneurs (12ASDS et 13ASDS), soit différentes combinaisons de deux séquences ciblant les ESE (12.1.2 ; 12.1.3 ; 12.1.4 ; 12.2.3 ; 12.2.4 ; 12.3.4 ; 13.1.2), comme schématisé sur la **figure 25**. L'ensemble de ces constructions a été réalisé par mutagenèse dirigée à partir du gène U7snRNA murin. Les fibroblastes n'étant pas (ou très peu) transfectables par plasmide, nous avons envisagé un autre type de transfert de gène : les vecteurs viraux. Compte tenu de la faible efficacité de transduction des vecteurs AAV dans les fibroblastes humains, nous avons décidé d'utiliser des vecteurs lentiviraux (LV), particulièrement efficaces. Comme décrit dans la **fiche technique n°1**, les 9 produits de PCR ont donc été clonés dans un plasmide vecteur nommé pRRL, contenant ainsi le transgène flanqué par les séquences virales LTR (Long terminal repeat), ainsi que la séquence  $\psi$  d'encapsidation. La production de lentivirus nécessite trois autres plasmides, à savoir le plasmide transportant les gènes *gag* et *pol* codant respectivement pour les protéines de capsid et les polymérases virales, le plasmide d'enveloppe (VSV-G) ainsi que le plasmide *rev* permettant un meilleur export nucléaire des ARN transcrits. La production des 9 lentivirus contenant les cassettes U7 (LV-U7) a ainsi été réalisée par quadri-transfection des cellules HEK293T (**Fiche technique n°2 en annexe**).



**Figure 25 : Représentation schématique des différentes constructions U7 réalisées.**

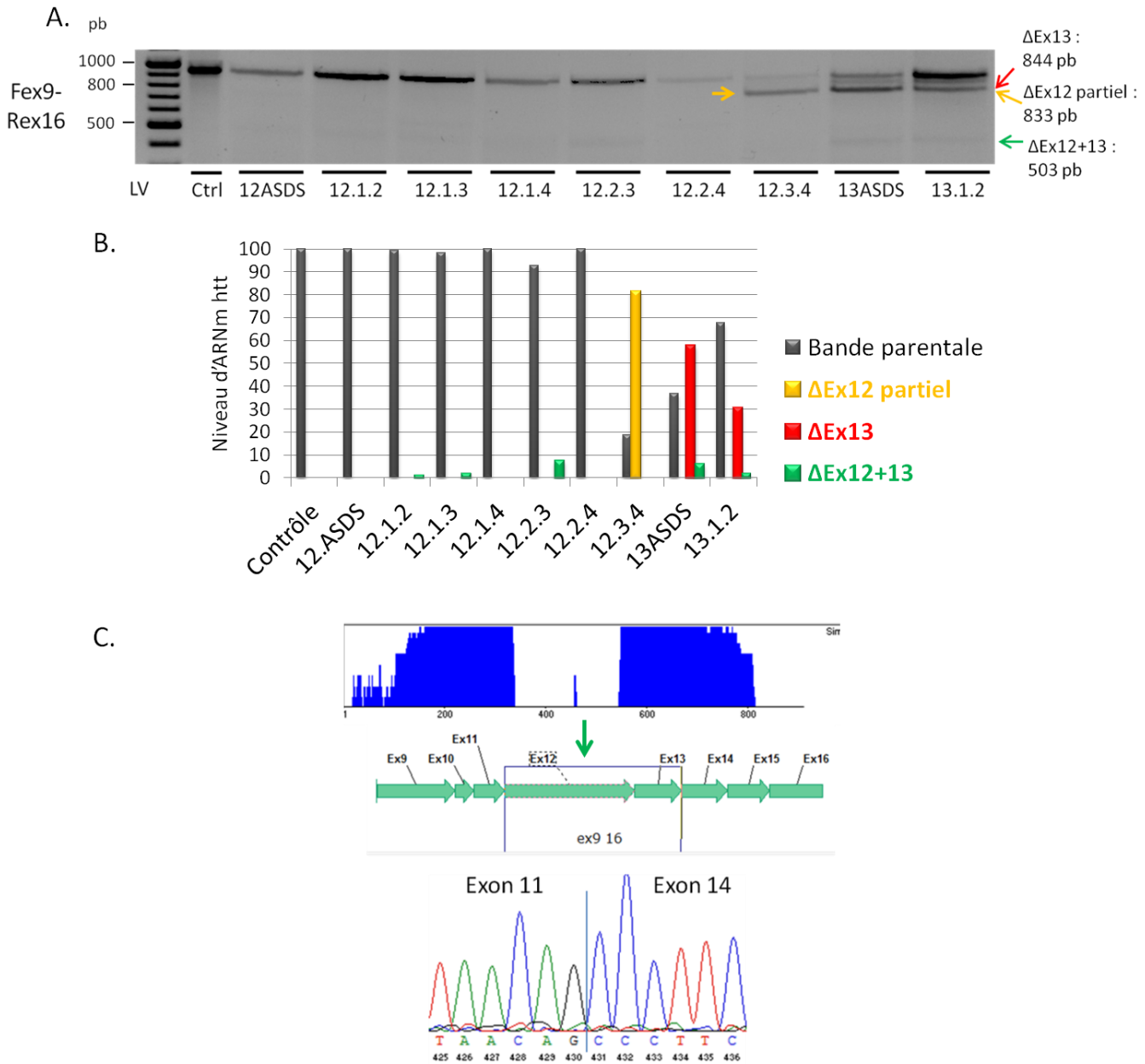
### b. Efficacité des approches antisens vectorisées

Afin de mettre au point les conditions de transduction, nous avons préalablement mis en présence différentes quantités de LV-GFP avec les fibroblastes. Le nombre de cellules GFP+ a été déterminé par cytométrie de flux : 80% de cellules positives ont été obtenues après ajout de 10µl de LV-GFP, 90% après 20µl et enfin 94% après 40µl. Nous avons donc décidé de transduire les fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) avec 20µl de chacun des lentivirus, permettant une bonne efficacité de transduction sans utiliser une quantité trop importante de vecteurs.

Après transduction, les fibroblastes sont amplifiés pendant une dizaine de jours avant d'être récoltés pour en extraire l'ARN. Des PCR sont ensuite réalisées entre les exons 9 et 16 (**figure 26A**). L'analyse de l'ARNm *HTT* n'a pas permis de détecter de saut d'exon pour les LV-U7-12ASDS, -12.1.2, -12.1.3, -12.1.4, -12.2.3, -12.2.4, suggérant l'inefficacité de ces 6 constructions. Cependant, le LV-U7-12.3.4 a induit un saut partiel de l'exon 12 avec une efficacité de 81%. De plus, les deux constructions ciblant l'exon 13 (13ASDS et 13.1.2) ont permis le saut efficace de cet exon, générant un fragment de 844pb. On peut également voir une bande de 503 pb correspondant au saut total des exons 12 et 13, mais présente en trop petite quantité (inférieure à 10%) pour entraîner un quelconque effet thérapeutique (**figure 26B**). Ces résultats ont été confirmés par séquençage (**figure 26C**). Le saut de l'exon 13 est, quant à lui, obtenu avec une efficacité variant entre 30 et 60% et pourrait représenter une autre approche thérapeutique alternative en induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Cet ARNm « anormal » pourrait alors être reconnu par le système NMD (nonsense-mediated mRNA decay) qui permet la dégradation des ARNm contenant des codons stop prématurés.

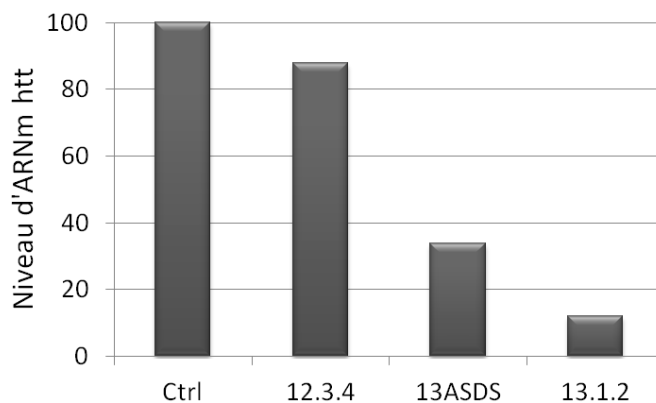
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié le niveau total d'ARNm *HTT* par PCR quantitative (**figure 27**), en amplifiant la région localisée entre les exons 7 et 8 comme décrit dans la **fiche technique n°10** en annexe. Le niveau est normalisé à l'aide du gène de référence *GAPDH*, et les résultats sont présentés en plaçant de manière arbitraire la condition contrôle à 100%. Nous observons une diminution de 60 à 80% du niveau total d'ARNm *HTT* avec les deux constructions U7 ciblant l'exon 13.





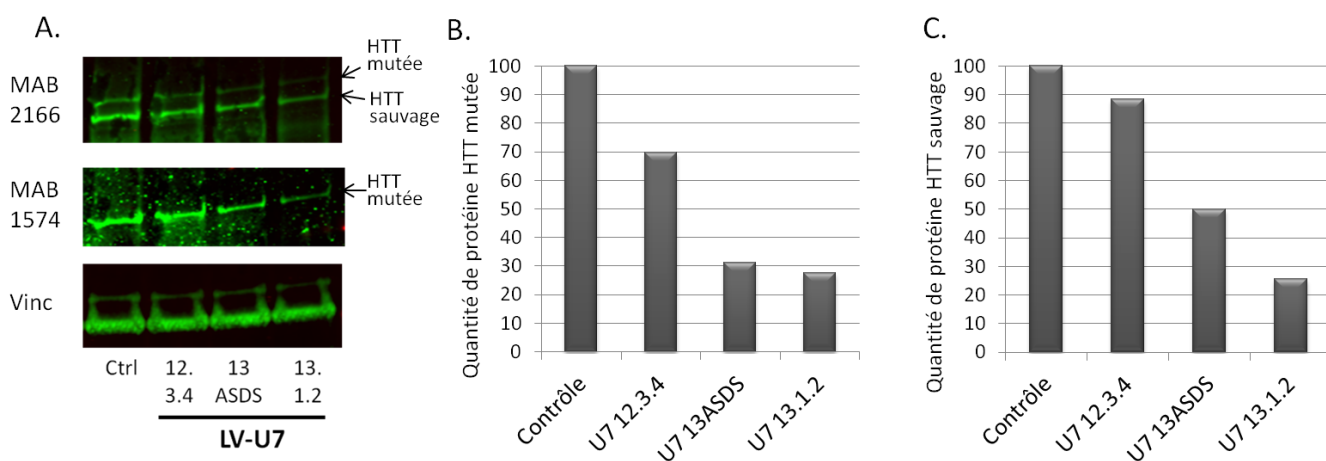
**Figure 26 : Efficacité des lentivirus-U7-siRNA ciblant les exons 12 et 13 après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG).**

**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR amplifiant les exons 9 à 16 montrant un saut partiel de l'exon 12 (flèche orange) ; un saut de l'exon 13 (flèche rouge) ainsi que le saut total d'exons 12 et 13 (flèche verte). **B.** Quantification des sauts d'exons obtenus. **C.** Séquençage de la bande indiquée par la flèche verte, montrant le saut des exons 12 et 13.



**Figure 27** : Evaluation du niveau d'ARNm *HTT* entre les exons 7 et 8 par qPCR après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) des lentivirus-U7-siRNA ciblant les exons 12 et 13.

Le niveau protéique a également été évalué par western blot, avec un protocole spécial détaillé dans la **fiche technique n°12** permettant de séparer muHTT et HTT sauvage. Deux anticorps ont été utilisés : MAB2166, capable de reconnaître les formes mutées et sauvages de HTT humaine et murine, et MAB1574, qui reconnaît l'expansion de polyglutamine et donc uniquement muHTT (**figure 28A**). La vinculine, protéine du cytosquelette de 117 kDa, est utilisée comme protéine de référence. La quantification de muHTT est présentée dans la **figure 28B** et celle de HTT sauvage dans la **figure 28C**. De la même façon que pour les analyses de qPCR, le contrôle est arbitrairement placé à 100%.



**Figure 28** : Evaluation du niveau protéique de la huntingtine après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) par des lentivirus-U7-siRNA ciblant les exons 12 et 13.

**A.** Western Blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT et HTT sauvage, et MAB1574 qui reconnaît uniquement muHTT. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine.

Nous observons une diminution assez importante (de 70% environ) de la quantité de protéine mutée et sauvage avec les deux constructions ciblant l'exon 13, ce qui semble corrélérer avec les résultats de qPCR.

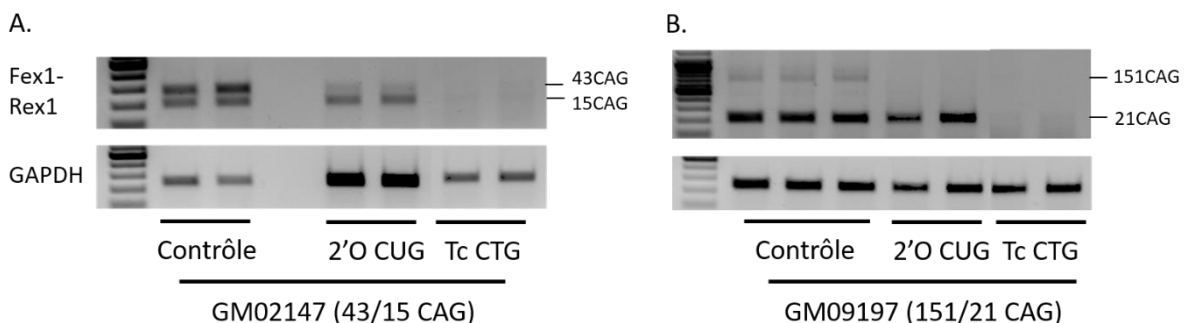
Ainsi, les résultats sont encourageants pour le saut de l'exon 13 qui pourrait aboutir à une diminution de la huntingtine de manière allèle non spécifique. Les deux constructions U7 correspondantes ont donc été passées en AAV2/9, vecteur permettant un transfert de gène efficace dans le cerveau, afin d'évaluer ces molécules *in vivo*. Concernant la stratégie d'élimination des sites de clivage par saut d'exon, nous avons éliminé 6 constructions qui n'induisent aucun saut d'exon, et sélectionné le U7-12.3.4, permettant le saut partiel de l'exon 12 et l'élimination de deux sites de clivage, pour une évaluation future de son efficacité chez la souris.

## B. Inactivation spécifique du gène *HTT* muté, en ciblant les répétitions CAG

### 1. Utilisation d'oligonucléotides antisens

L'une des stratégies permettant de diminuer préférentiellement l'expression de l'allèle muté consiste à cibler les répétitions CAG. Comme décrit précédemment dans l'introduction, les ASO entièrement modifiés, donc incapables d'activer la RNase H, ciblant les CAG vont s'hybrider préférentiellement à l'allèle muté puisqu'il contient davantage de répétitions. Cela va avoir pour effet d'empêcher la traduction, et donc *in fine* de diminuer le niveau de muHTT. Ainsi, un 2'O-méthyl-ARN (2'O CUG) de 20 nucléotides et un Tc-DNA (Tc CTG) de 15 nucléotides, spécifiques des répétitions CAG, ont été transfectés dans les 4 lignées de fibroblastes de patients atteints de la MH. Le niveau d'ARNm *HTT* a été évalué par RT-PCR, en amplifiant l'exon 1, de part et d'autre des répétitions CAG afin de distinguer les transcrits mutés des transcrits sauvages (**fiche technique n°9** en annexe).

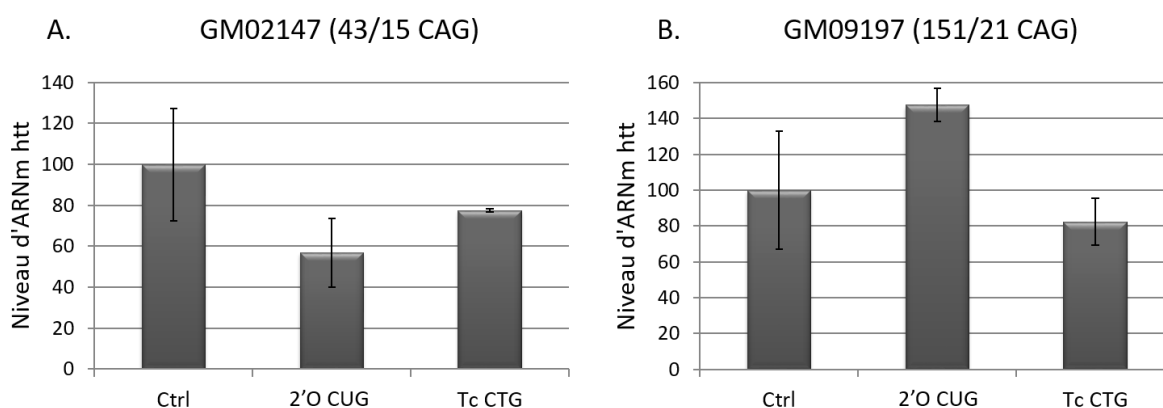
Comme on le voit sur la **figure 29A**, la lignée GM02147 présente deux bandes en condition contrôle. En effet, la bande supérieure correspond à l'allèle muté, avec 43 répétitions CAG, alors que la bande inférieure représente l'allèle sauvage avec 15 répétitions CAG. Les résultats de la PCR avec la lignée GM09197 montrent une différence d'expression très importante entre l'allèle muté comprenant 151 répétitions CAG et l'allèle sauvage qui en comporte 21 (**figure 29B**). Dans les différentes lignées, le 2'O CUG semble entraîner une diminution spécifique de l'allèle muté, alors que le Tc-DNA semble induire un *silencing* pratiquement total des 2 allèles. Ces résultats sont assez surprenants étant donné que les ASO ne sont pas censés diminuer le niveau d'ARNm *HTT*.



**Figure 29 : Effet des ASO ciblant les répétitions CAG sur l'ARNm *HTT*.**

**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR de l'exon 1 permettant l'amplification des ARNm mutés et sauvages, après transfection des fibroblastes GM02147 (43/15 CAG) avec 2'O CUG et Tc CTG. **B.** RT-PCR après transfection de GM09197 (151/21 CAG) avec 2'O CUG et Tc CTG. Résultats représentatifs de 2 transfections pour chaque lignée.

Afin de vérifier ces résultats, le niveau total d'ARNm *HTT* a été évalué par PCR quantitative au niveau des exons 7 et 8 de *HTT*, ce qui ne nous permet plus de différencier l'allèle muté de l'allèle sauvage (**Figure 30**). Dans un premier temps, il est important de noter qu'il y a une grande variabilité au sein des échantillons contrôles (barres d'erreur importantes). Dans la lignée GM02147 (43/15 CAG), le 2'O CUG semble induire une diminution du niveau total d'ARNm *HTT*, alors que dans la lignée GM09197 (151/21 CAG), l'oligonucléotide ne semble pas avoir d'effet. En revanche, les résultats de la qPCR après traitement par le Tc CTG ne montrent pas un effet aussi important que dans la RT-PCR précédente autour de l'exon 1 (**Figure 29**) où il y avait une extinction presque totale de l'ARNm *HTT*.



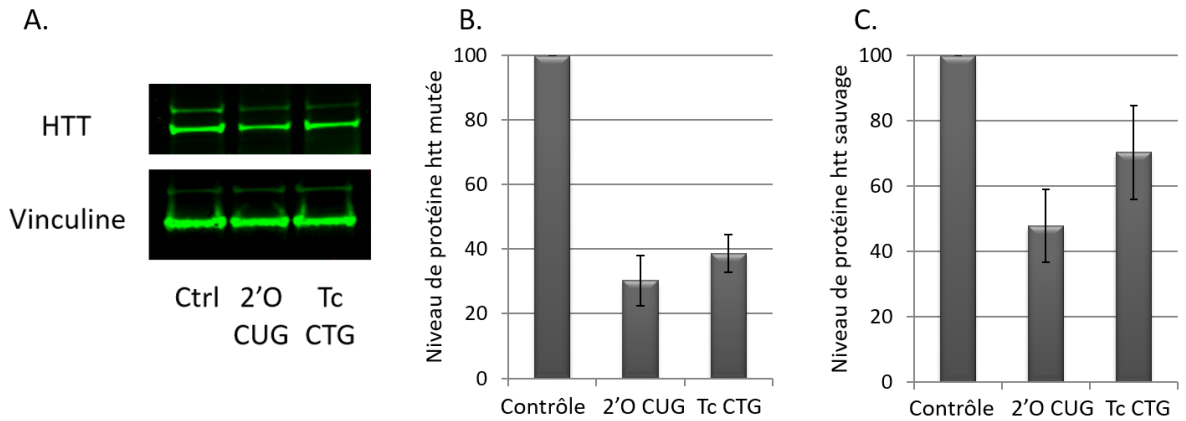
**Figure 30 : Evaluation du niveau d'ARNm *HTT* par PCR quantitative après transfection des oligonucléotides antisens ciblant les répétitions CAG.**

**A.** Transfection des fibroblastes GM02147 (43/15 CAG). **B.** Transfection des fibroblastes GM09197 (151/21 CAG). Moyenne des duplicats  $\pm$  SD.

Afin de comprendre les différences entre les résultats de RT-PCR autour de l'exon 1 et ceux de qPCR entre les exons 7 et 8, de nouvelles RT-PCR ont été réalisées à d'autres endroits sur l'ARNm *HTT*, après les répétitions CAG (**fiche technique n°9** en annexe). Les PCR entre les exons 1 et 5 ainsi qu'entre les exons 9 et 16 ne montrent pas de diminution du niveau de l'ARNm *HTT* (résultats non montrés). Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est que le Tc-DNA, qui est très affiné pour sa cible, soit toujours présent après l'extraction d'ARN et empêche la réaction de RT-PCR autour des répétitions (région de fixation). Ainsi, en amplifiant une région différente de celle sur laquelle se fixe l'oligonucléotide, on s'affranchit de ce biais.

Bien que l'effet sur l'ARNm ne soit pas totalement clair, le plus important est de savoir si les ASO ont la capacité de bloquer les mécanismes de traduction et donc d'induire une diminution du niveau de HTT. Nous avons donc évalué l'expression protéique par western

blot (**Figure 31A**). La quantification du niveau de muHTT (bande supérieure) a été réalisée : on observe une diminution d'environ 60% (**Figure 31B**). D'autre part, le Tc CTG semble plus spécifique car il induit une diminution d'environ 30% de la protéine sauvage, contre 50% pour le 2'O CUG (**Figure 31C**).



**Figure 31 : Evaluation du niveau protéique de HTT après transfection de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) des oligonucléotides antisens ciblant les répétitions CAG.**

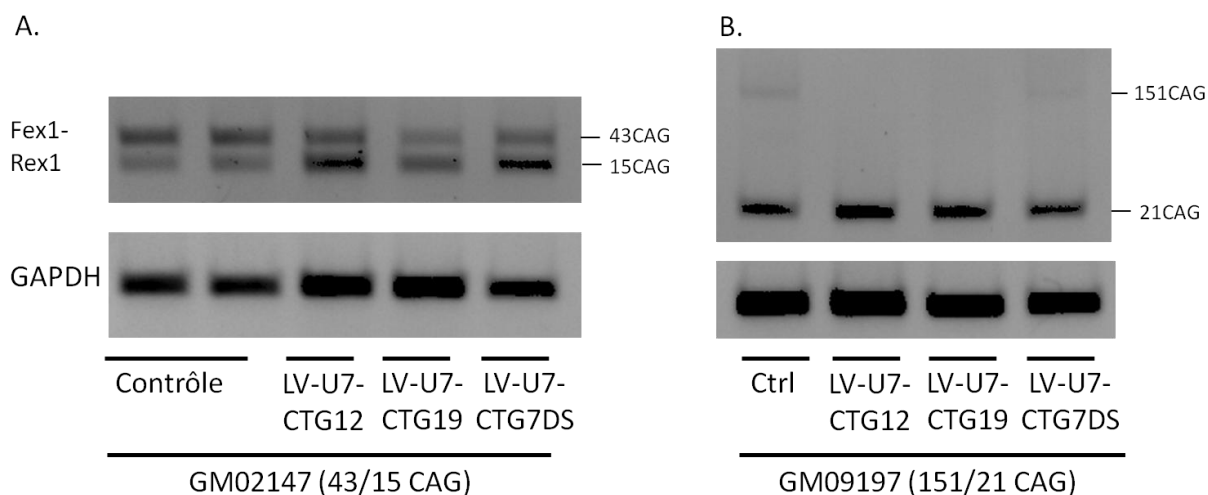
**A.** Western Blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT et HTT sauvage. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de 3 transfactions.

Le Tc-DNA CTG induit donc une diminution de muHTT, en empêchant la traduction car il n'affecte pas la quantité de transcrits. Cette stratégie prometteuse a également été étudiée *via* une approche vectorisée.

## 2. Utilisation d'une approche vectorisée

Le système U7snRNA a été utilisé pour cibler les répétitions CAG, car en plus de conduire à une expression stable des séquences antisens, il permet d'augmenter le nombre de nucléotides ciblés et donc potentiellement la spécificité vis-à-vis de l'allèle muté. En effet, il a été démontré que les U7snRNA peuvent contenir des antisens de 20 à 60 nucléotides. Nous avons donc inséré par mutagénèse dirigée 12 (U7-CTG12) ou 19 CTG (U7-CTG19). Nous avons également construit une cassette U7 ciblant deux séquences différentes : 7 répétitions CTG ainsi que le site donneur de l'exon 1 (U7-CTG7DS), afin d'induire une dérégulation de l'épissage préférentiellement sur l'allèle muté. Comme décrit précédemment, afin d'obtenir un transfert de gène efficace dans les fibroblastes pour évaluer ces différents U7, nous avons vectorisé ces 3 constructions U7 dans des lentivirus.

Bien que la stratégie U7-CTG ne soit pas censée impacter les niveaux de transcrits, nous avons tout de même évalué les niveaux d'ARNm *HTT* muté et sauvage par RT-PCR après les différentes transductions des fibroblastes avec les 3 LV-U7-snrRNA (**figure 32**). Dans la lignée GM02147 (43/15 CAG), on observe une légère diminution de l'allèle muté dans les trois conditions, notamment pour le LV-U7-CTG19. Dans la lignée GM09197 (151/21 CAG), l'expression initiale de l'allèle muté est très faible par rapport à celle de l'allèle sauvage. On note tout de même que les constructions contenant respectivement 12 et 19 répétitions CTG semblent induire une diminution totale du transcrit muté, sans pour autant diminuer l'expression de l'ARNm sauvage. Pour les raisons données précédemment, ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné que les U7 ciblent la même région que celle amplifiée par PCR. Cette diminution reflète donc potentiellement un artefact de RT-PCR.

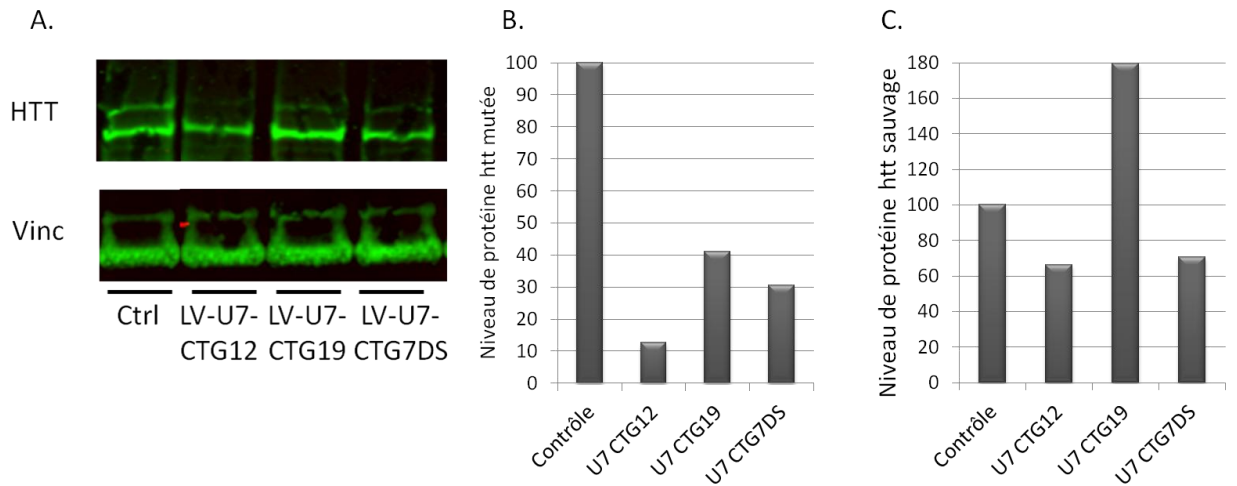


**Figure 32 : Evaluation des lentivirus-U7-snrRNA ciblant les répétitions CAG de l'ARNm *HTT*.**

**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR de l'exon 1 permettant l'amplification des ARNm mutés et sauvages, après transfection des fibroblastes GM02147 (43/15 CAG). **B.** RT-PCR après transfection des fibroblastes GM09197 (151/21 CAG).

Le niveau protéique de la huntingtine après ces différentes transductions a été évalué par western blot (**figure 33A**). Les 3 constructions ciblant les répétitions CAG semblent induire une diminution très importante de muHTT, variant de 60 à 85% de réduction (**figure 33B**). De plus, l'impact sur la protéine sauvage semble minime, avec une réduction de 30% seulement (**figure 33C**). L'effet de ces constructions paraît donc relativement spécifique de muHTT. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution car les expériences n'ont pu être réalisées qu'une seule fois, à cause de la toxicité des lentivirus sur les fibroblastes de patients MH particulièrement fragiles. D'autre part, le western blot est de mauvaise qualité, ce qui peut biaiser la quantification. On remarque d'ailleurs une forte augmentation de la

quantité de protéine sauvage avec le LV-U7-CTG19, ce qui n'est pas cohérent et nécessite donc d'être validé à nouveau. Cependant, ces résultats préliminaires restent encourageants et montrent la potentielle efficacité de ces constructions. Les trois U7 ont donc été vectorisés à nouveau dans un AAV2/9 afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*.



**Figure 33 : Evaluation du niveau protéique de HTT après transduction de fibroblastes GM09197 (151/21 CAG) avec des LV-U7 ciblant les répétitions CAG.**

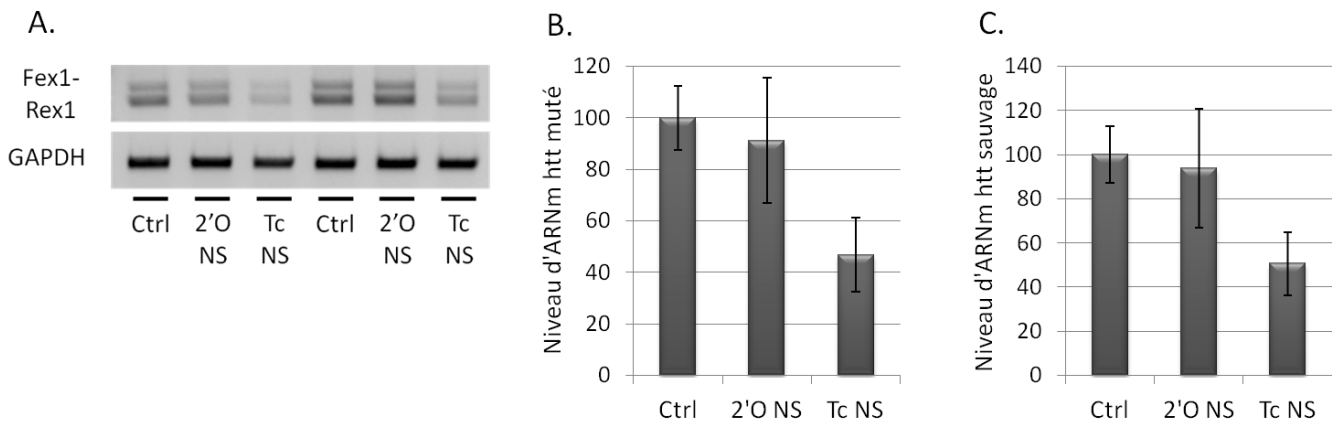
**A.** Western Blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT et HTT sauvage. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine.



## C. Inactivation allèle non spécifique du gène *HTT*

### 1. Utilisation d'oligonucléotides antisens

L'approche plus globale, permettant de réduire le niveau total d'ARNm *HTT*, consiste à utiliser des oligonucléotides antisens *gapmer* capables de se lier à leur cible et d'induire leur dégradation *via* un mécanisme impliquant la RNase H. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'utilisation de 2'MOE *gapmer* ciblant l'exon 36 du gène *HTT* a démontré une très bonne efficacité et est actuellement en essai clinique. Nous avons par conséquent choisi cette séquence et dessiné un TcDNA plus court, appelé Tc NS (pour Non Spécifique), ciblant cette région. C'est un *gapmer* comportant seulement 15 nucléotides, avec 4 nucléotides modifiés de part et d'autre et 7 nucléotides non modifiés au centre (4/7/4). Comme contrôle, nous avons utilisé un 2'O-méthyl-ARN de 20 nucléotides strictement identique à la séquence publiée par Kordasiewicz *et al.*, appelé ici 2'O NS, et comportant 5 nucléotides modifiés, 10 inchangés, et enfin 5 modifiés (5/10/5). L'efficacité de ces séquences a été évaluée *in vitro* après transfection dans différentes lignées de fibroblastes. L'analyse de l'ARNm a d'abord été réalisée par RT-PCR, dont un gel représentatif est exposé **figure 34A**.



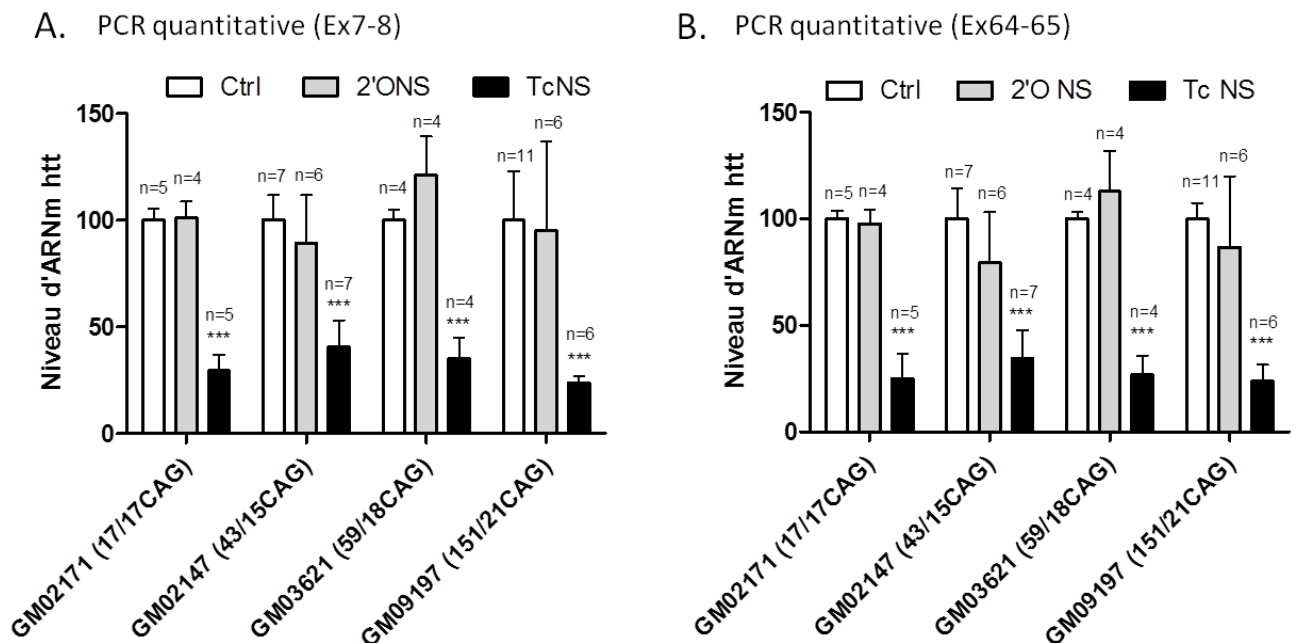
**Figure 34 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm *HTT*, après transfection de fibroblastes GM03621 (59/18 CAG).**

**A.** Gel d'agarose de la RT-PCR amplifiant l'exon 1 des ARNm mutés et sauvages **B.** Quantification sur gel des transcrits *HTT* mutés. **C.** Quantification sur gel des transcrits *HTT* sauvages. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SD.

La quantification ne montre aucune baisse du niveau d'ARNm avec le 2'O NS. En revanche, après traitement au Tc NS, on obtient une diminution de 50% de l'allèle muté (**figure 34B**) et de l'allèle sauvage (**figure 34C**) de la huntingtine. Ici, nous n'avons pas réalisé la PCR sur le site de fixation de l'oligonucléotide, puisque la réaction de polymérisation s'effectue au

niveau de l'exon 1 et que le Tc NS cible l'exon 36. Il n'y a donc pas de raison apparente pour que le Tc NS bloque la RT-PCR et nous donne un résultat erroné comme c'était le cas pour le Tc CTG.

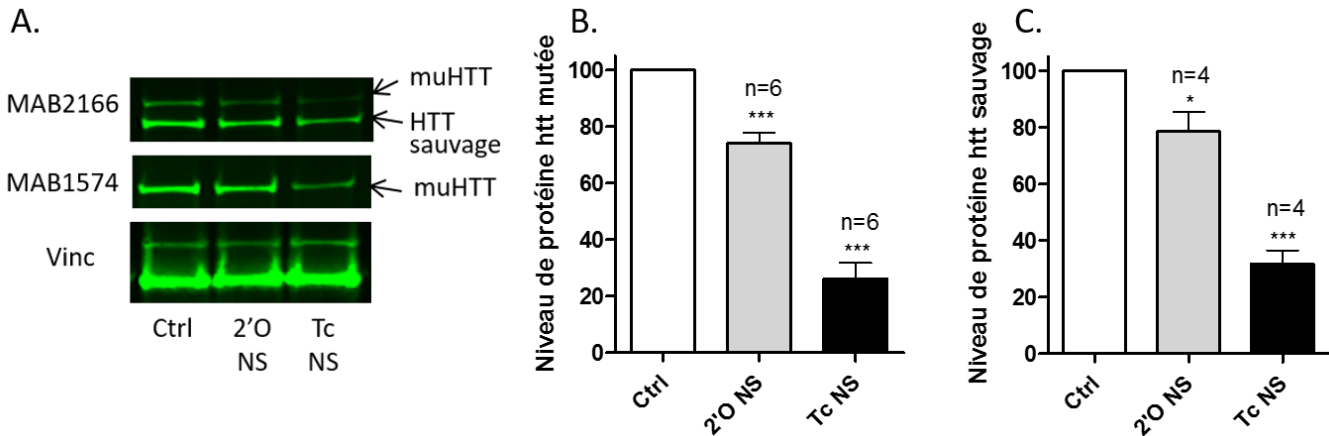
Des PCR quantitatives ont néanmoins été effectuées pour confirmer les résultats obtenus en RT-PCR (**figure 35**). Ces expériences de transfections ont été réalisées plusieurs fois dans chacune des lignées (le nombre est précisé sur le graphique pour chacune des conditions). Ces résultats sont cohérents avec les résultats de RT-PCR précédents puisque le 2'O NS ne semble pas efficace. En effet, aucun effet n'est observé avec cet ASO, alors que le Tc NS entraîne une diminution significative du niveau d'ARNm *HTT* de 60 à 70%, ce qui est très encourageant.



**Figure 35 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau total d'ARNm *HTT*, après transfection dans les différentes lignées de fibroblastes.**

**A.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. **B.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ; n=4 à 11. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 1 facteur, comparaisons multiples de Dunnett.

Nous avons également évalué le niveau de HTT par western blot. Les quantifications de protéines ont été préférentiellement réalisées après transfection de GM09197 (151/21 CAG) car il est plus facile de séparer le doublet protéique dans cette lignée. Un western blot représentatif est présenté **figure 36A**, où l'on observe effectivement une diminution de HTT totale en présence de Tc NS. Les quantifications montrent une diminution significative de HTT mutée et sauvage de 20 à 30% avec 2'O NS, contre 70% avec TcNS (**Figures 36 B et C**).

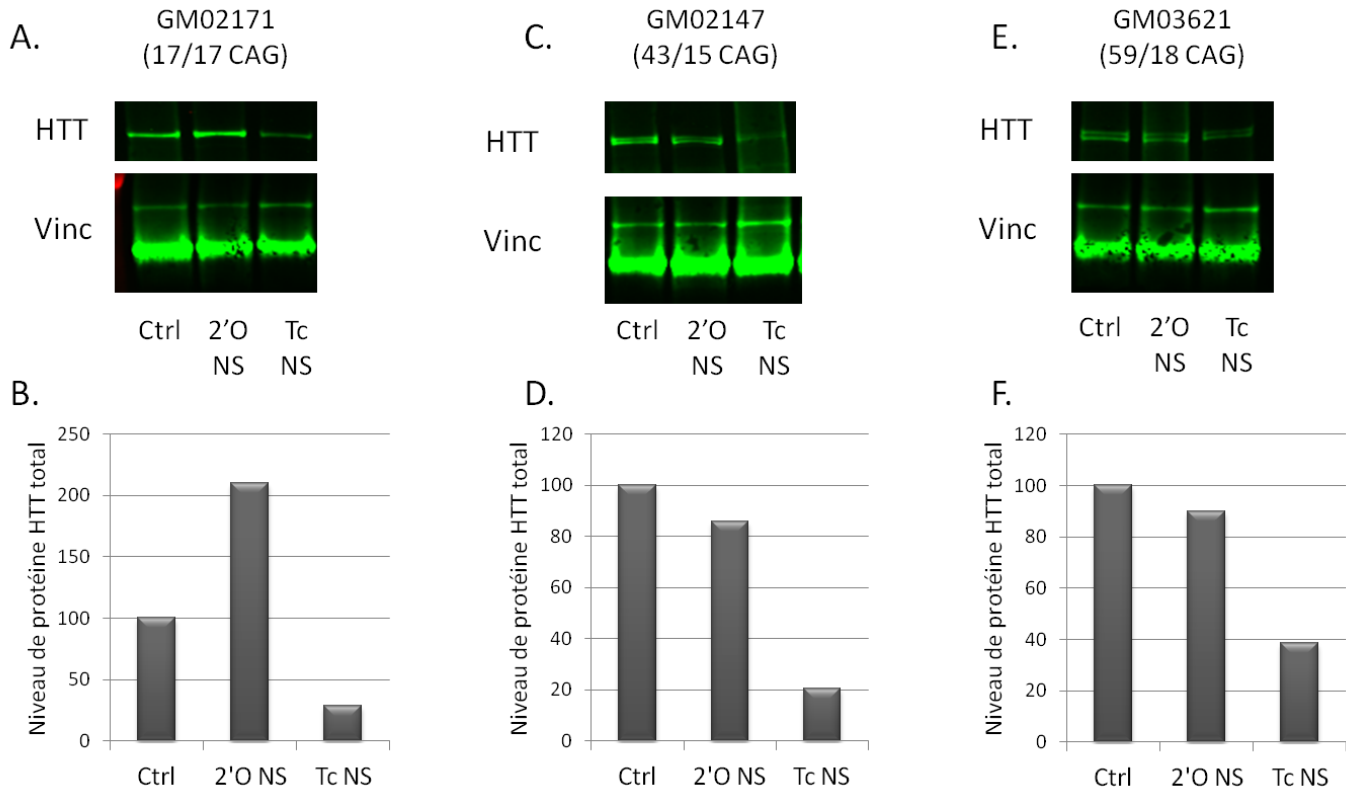


**Figure 36 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau de protéine HTT, après transfection de GM09197 (151/21CAG).**

**A.** Western Blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT et HTT sauvage, et MAB1574 qui reconnaît uniquement muHTT. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ; n=4 à 6. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ , Test ANOVA à 1 facteur, comparaisons multiples de Dunnett.

Ces résultats prometteurs ont également été obtenus dans les trois autres lignées. En effet, Tc NS est capable de diminuer l'expression de HTT dans la lignée contrôle GM02171 (17/17CAG) comme on le voit dans les **figures 37 A et B**. Bien qu'il n'ait pas été possible de séparer muHTT de la protéine sauvage dans les deux autres lignées, on voit tout de même une diminution très importante du niveau de HTT total (**Figures 37 C, D, E et F**).

Ainsi, le Tc NS est capable de diminuer efficacement la quantité de HTT totale, de manière allèle non spécifique puisqu'il agit aussi bien sur HTT sauvage que sur muHTT.

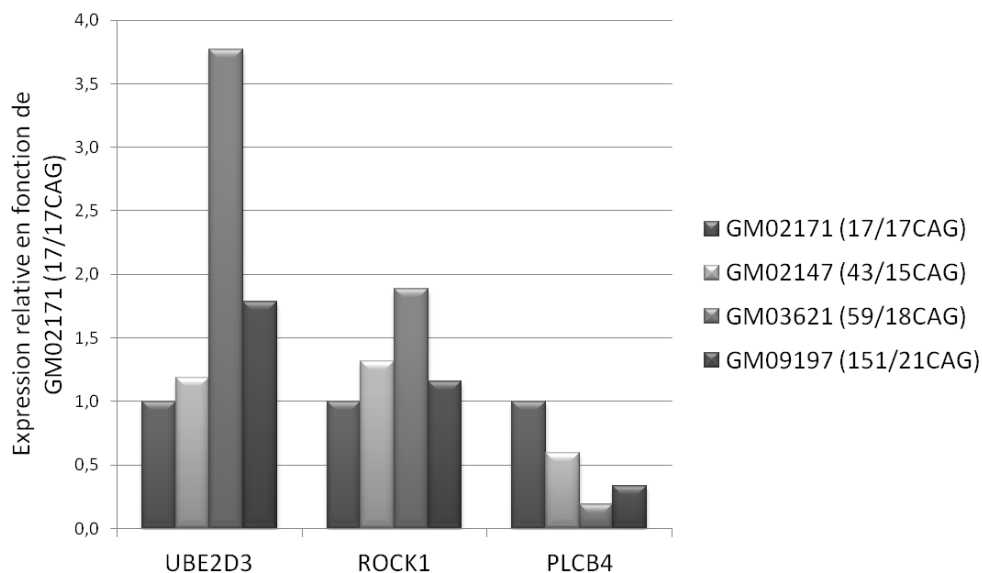


**Figure 37 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau de HTT, après transfection de GM09197 (151/21CAG).**

**A.** Western blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît HTT sauvage sur GM02171 (17/17CAG). **B.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine. **C.** WB après transfection de GM02147 (43/15 CAG). **D.** Quantification de HTT totale (mutée et sauvage) normalisée par rapport à la vinculine. **E.** WB après transfection de GM03621 (59/18CAG). **F.** Quantification de HTT totale (mutée et sauvage) normalisée par rapport à la vinculine.

#### D. Recherche de biomarqueurs *in vitro*

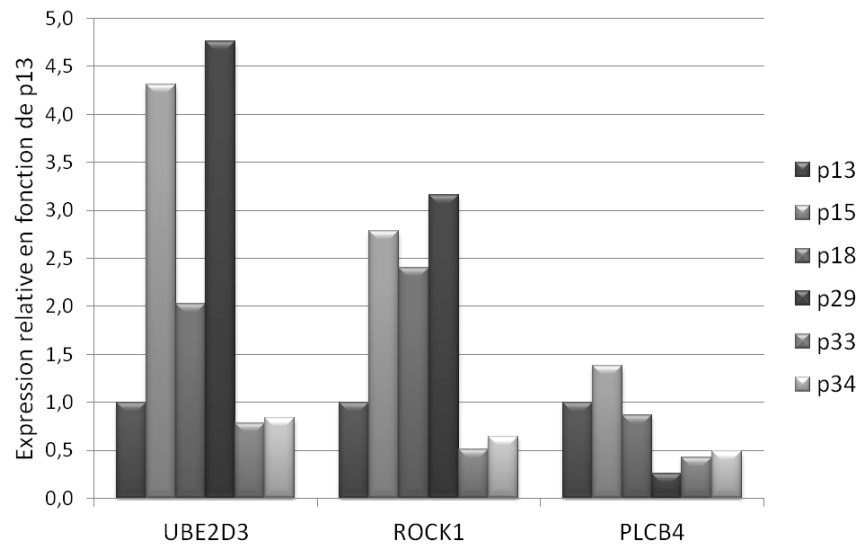
Afin de compléter l'étude de l'efficacité des différents oligonucléotides, nous avons recherché des biomarqueurs des fibroblastes. En effet, Marchina *et al.* décrivent plusieurs gènes comme étant surexprimés dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Huntington. Nous avons donc quantifié l'expression de trois gènes, *PLCB4*, *UBE2D3* ainsi que *ROCK1* dans les 4 lignées de fibroblastes par PCR quantitative (**Figure 38**). Les résultats ont été exprimés en fonction de la lignée contrôle GM02171, comportant 17 répétitions CAG sur les deux allèles, dont le niveau d'expression a été arbitrairement placé à 1. *UBE2D3* et *ROCK1* semblent surexprimés dans la lignée GM03621 (58/18 CAG). A l'inverse, *PLCB4* est sous-exprimé dans les 3 lignées malades.



**Figure 38 : Quantification des biomarqueurs par qPCR dans les différents types cellulaires.**

L'expression de *UBE2D3*, *ROCK1* et *PLCB4* dans la lignée contrôle GM02171 a été arbitrairement placée à 1.

Suite à ces résultats surprenants qui sont en contradiction avec les travaux publiés par Marchina *et al.*, nous avons voulu savoir si l'expression de ces gènes est stable au sein d'une même lignée, en l'occurrence les cellules contrôles GM02171 (17/17 CAG). Nous avons donc étudié l'expression de ces gènes à différents passages, en plaçant de manière arbitraire le niveau d'expression du passage le plus précoce à 1. Comme on le voit sur la **figure 39**, l'expression de ces gènes au cours du temps est très variable dans une même lignée, il n'est donc pas possible de les utiliser comme biomarqueurs.



**Figure 39 : Quantification des biomarqueurs dans différents échantillons de la lignée contrôle GM02171 (17/17 CAG).**

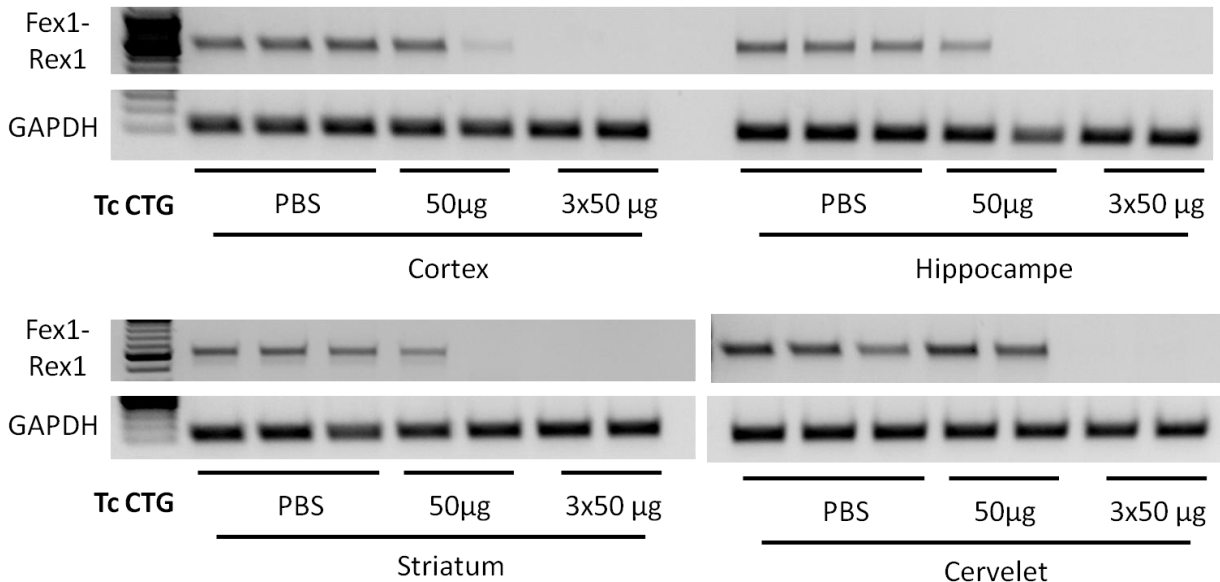
L'expression de *UBE2D3*, *ROCK1* et *PLCB4* au passage 13 a été arbitrairement placée à 1.

## II. Evaluation *in vivo* des approches antisens

### A. *Silencing* allèle spécifique, en ciblant les répétitions CAG

#### 1. Utilisation d'oligonucléotides antisens

Les expériences menées *in vitro* avec le Tc CTG ont montré des résultats intéressants, avec une diminution de la quantité de muHTT, sans impacter le niveau de transcrits *HTT*. Cet oligonucléotide a donc été injecté par voie ICV dans des souris YAC128 (**Fiche technique n°7**) qui, en plus des deux allèles *Hdh* murins sauvages, contiennent le gène *HTT* humain entier avec 128 répétitions CAG. Les souris ont reçu soit une seule injection de 50 ou 100 µg de Tc CTG, soit 3 doses de 50µg (50µg/sem sur trois semaines) grâce à un système de canule permettant de réaliser des injections répétées. Dans un premier temps, les souris ont été sacrifiées deux semaines après la fin du traitement afin de prélever différentes régions du cerveau. Le cortex, l'hippocampe, le striatum ainsi que le cervelet ont ensuite été isolés pour analyser l'efficacité des traitements dans les différentes régions du cerveau. Compte tenu des résultats observés *in vitro*, nous avons tenu à regarder le niveau d'ARNm *HTT* par RT-PCR en amplifiant les répétitions CAG, qui est la zone de fixation des Tc CTG (**Figure 40**).

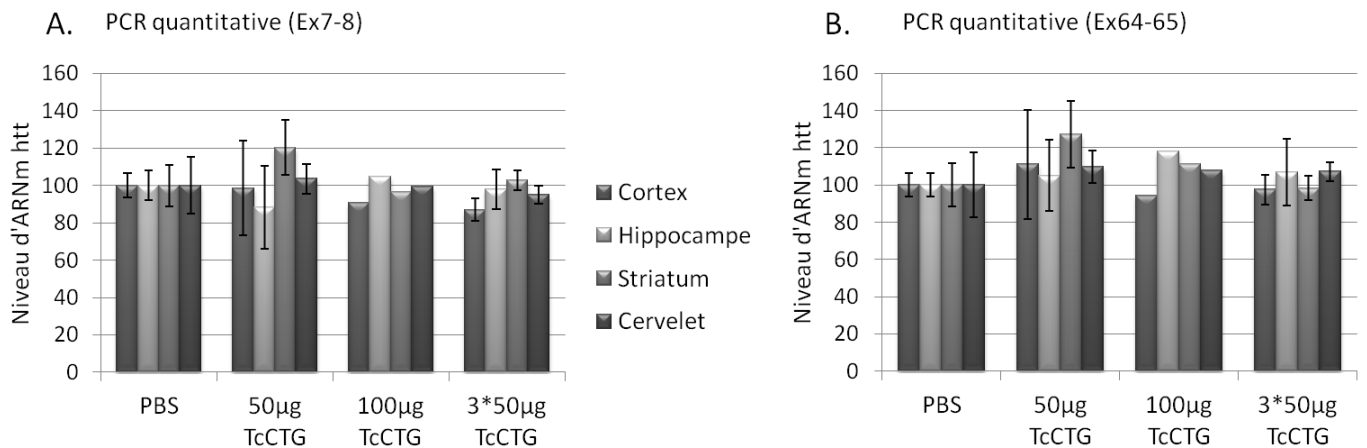


**Figure 40 : Gels d'agarose de RT-PCR permettant d'amplifier l'exon 1 avec les répétitions CAG.**

L'effet de Tc CTG sur le niveau d'expression de *HTT* est ainsi évalué dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et le cervelet après injections de différentes doses de Tc CTG dans le ventricule latéral droit de souris YAC128. n=3 souris injectées avec du PBS, 2 injectées avec 50µg de Tc CTG et 2 injectées avec 3x50µg de Tc CTG.

Les gels montrent une diminution du niveau d'ARNm *HTT* dans l'ensemble du cerveau (cortex, hippocampe, striatum et cervelet) dans les souris ayant reçu 3 fois 50 µg de Tc CTG.

Afin de savoir si ce résultat est un biais dû à la fixation de l'ASO sur la région à amplifier ou si le Tc CTG influe réellement sur le niveau d'ARNm *HTT*, des PCR quantitatives ont été réalisées au niveau des exons 7 et 8 (**Figure 41A**) et 64 et 65 (**Figure 41B**). Les TcCTG n'entraînent donc pas de diminution du transcrit *HTT*, ce qui est cohérent avec ce que l'on avait observé *in vitro*.

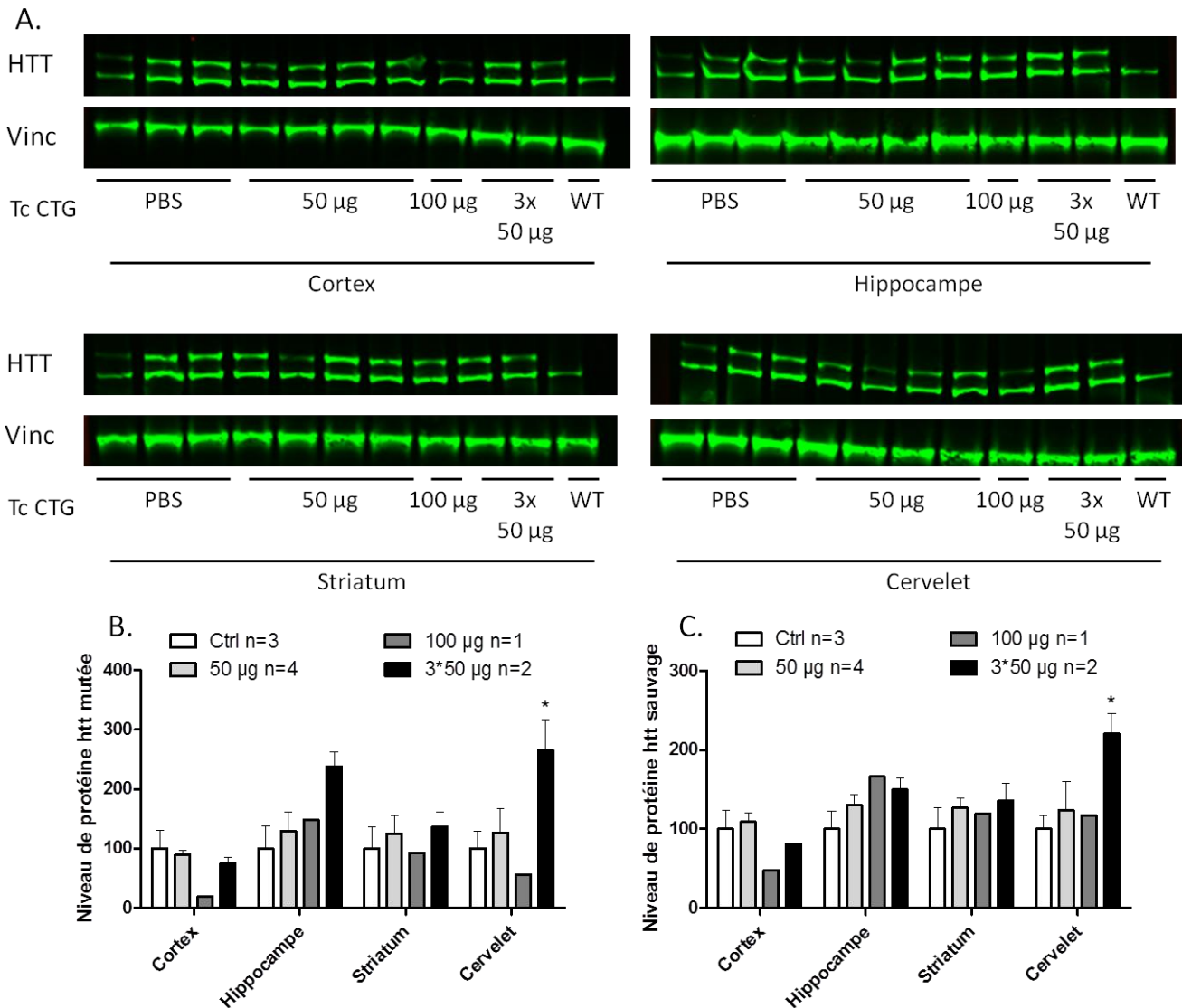


**Figure 41 : Effet des ASO synthétiques sur le niveau total d'ARNm *HTT* dans le cortex, hippocampe, striatum et cervelet après injection de différentes doses de Tc CTG dans le ventricule latéral droit de souris YAC128.**

**A.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. **B.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=3 souris injectées avec du PBS, 4 injectées avec 50µg de Tc CTG, 1 injectée avec 100 µg et 2 injectées avec 3x50µg de Tc CTG.

Afin de voir si le Tc CTG est capable de bloquer la traduction *in vivo*, nous avons évalué le niveau de HTT par western blot. L'anticorps MAB2166 permet de révéler le doublet protéique : la bande supérieure correspond à muHTT humaine et la bande inférieure à HTT sauvage murine (**Figure 42A**). Le dernier puits correspond à un échantillon de souris sauvage, et confirme bien la présence de la protéine murine uniquement. Globalement, il n'y a pas de diminution significative de HTT après injections des différentes doses de Tc CTG.





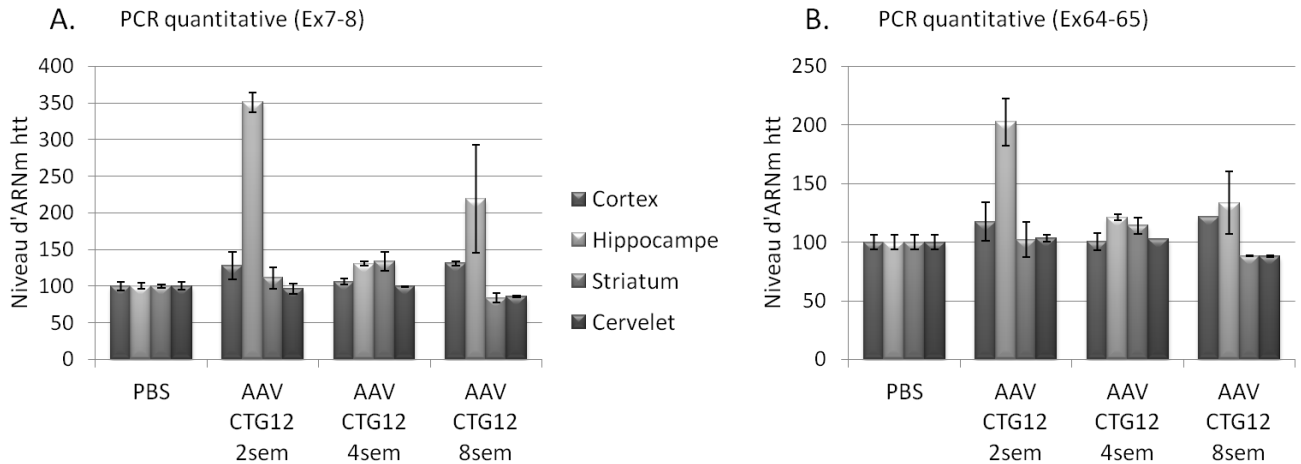
**Figure 42 : Evaluation du niveau de HTT dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et le cervelet après injection de différentes doses de Tc CTG dans le ventricule latéral droit de souris YAC128.**

A. Western blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT humaine et HTT murine. B. Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. C. Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=3 souris injectées avec du PBS, 4 injectées avec 50µg de Tc CTG, 1 injectée avec 100 µg et 2 injectées 3x50µg de Tc CTG. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni. WT : Souris sauvage (pour Wild-Type).

## 2. Utilisation d'une approche vectorisée

Suite aux résultats encourageants obtenus *in vitro* avec les lentivirus U7-CTG12, CTG19 et CTG7DS, ces constructions U7 ont été vectorisées dans un vecteur AAV2/9 afin de permettre un transfert de gène efficace dans le cerveau. Basé sur les résultats de notre étude *in vitro*, nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité du U7-CTG12. Les souris ont été

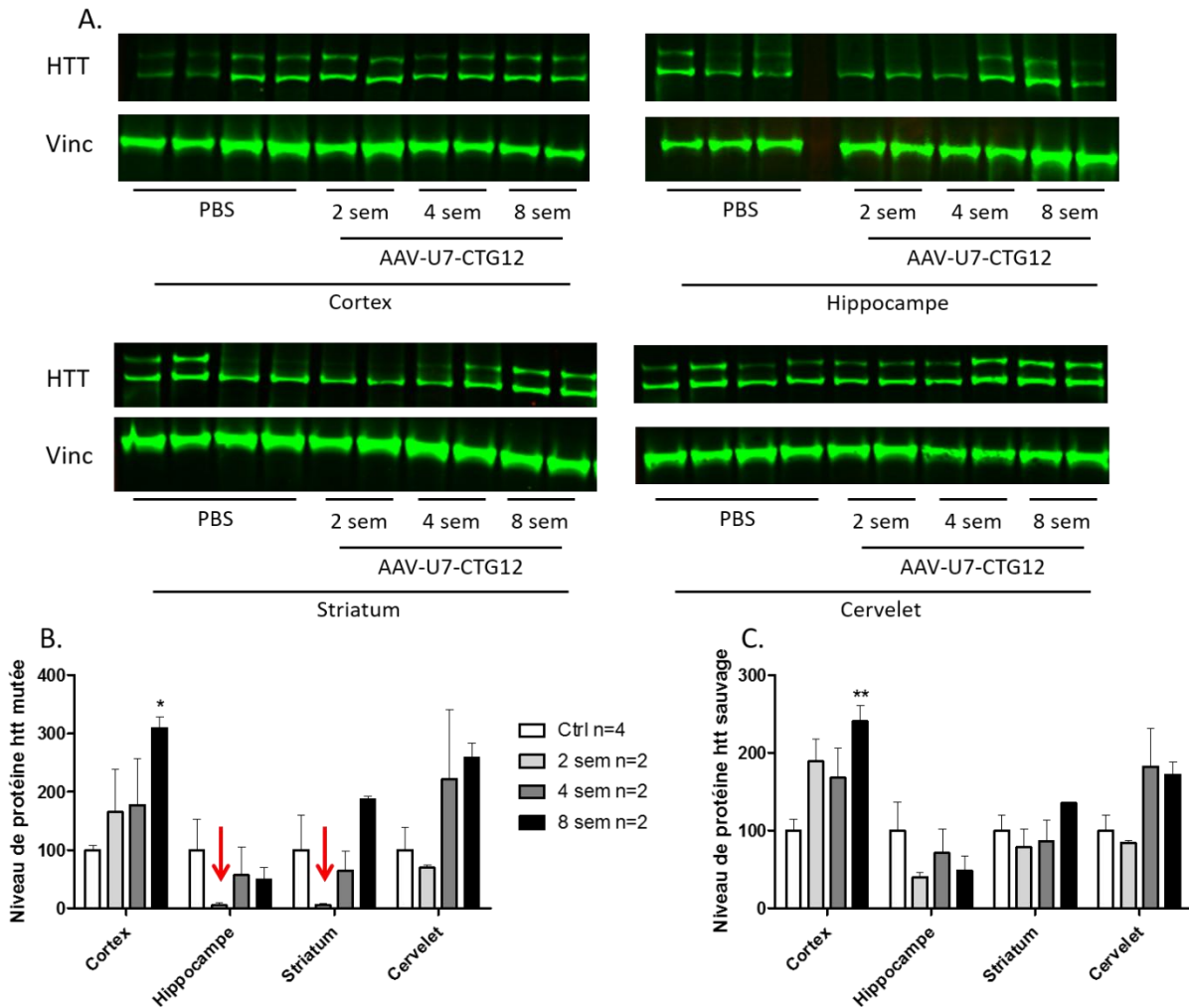
injectées en ICV avec 3µl de AAV-U7-CTG12 à  $1,8 \times 10^{12}$  vg/ml, soit  $5,4 \times 10^9$  vg, et ont été analysées 2, 4 ou 8 semaines après injection. La PCR quantitative présentée **figure 43** montre une absence de diminution d'ARNm *HTT* dans les différentes parties du cerveau quelle que soit la durée post-injection.



**Figure 43 : Effet des AAV-U7snRNA ciblant les répétitions CAG après injection ICV chez la souris YAC128 sur le niveau d'ARNm *HTT*.**

**A.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. **B.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65.

Comme précédemment, les niveaux de *HTT* ont été évalués afin de savoir si l'AAV-U7-CTG12 est capable de bloquer la traduction de la huntingtine. Comme on le voit sur la **figure 44A**, les valeurs obtenues pour les souris injectées avec du PBS sont extrêmement variables, ce qui empêche de pouvoir conclure sur l'efficacité de la molécule. En effet, comme on le voit sur les graphiques, la diminution de muHTT est très forte dans l'hippocampe et dans le striatum deux semaines après injection (flèches rouges), mais cela n'est pas significatif puisque les niveaux de certaines souris injectées avec du PBS sont également très bas. Il est donc nécessaire de répéter ces injections afin d'obtenir un nombre de souris plus important et de pouvoir conclure quant à l'efficacité de ces AAV-U7-CTG.



**Figure 44 : Effet des AAV-U7 ciblant les répétitions CAG sur le niveau de HTT après injection ICV de souris YAC128.**

**A.** Western blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT et HTT murine dans les différentes structures cérébrales étudiées. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=4 souris injectées avec du PBS, 6 souris injectées avec  $5,4 \times 10^9$  vg d'AAV-U7-CTG12, dont 2 ont été sacrifiées 2, 4 et 8 semaines après injection. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

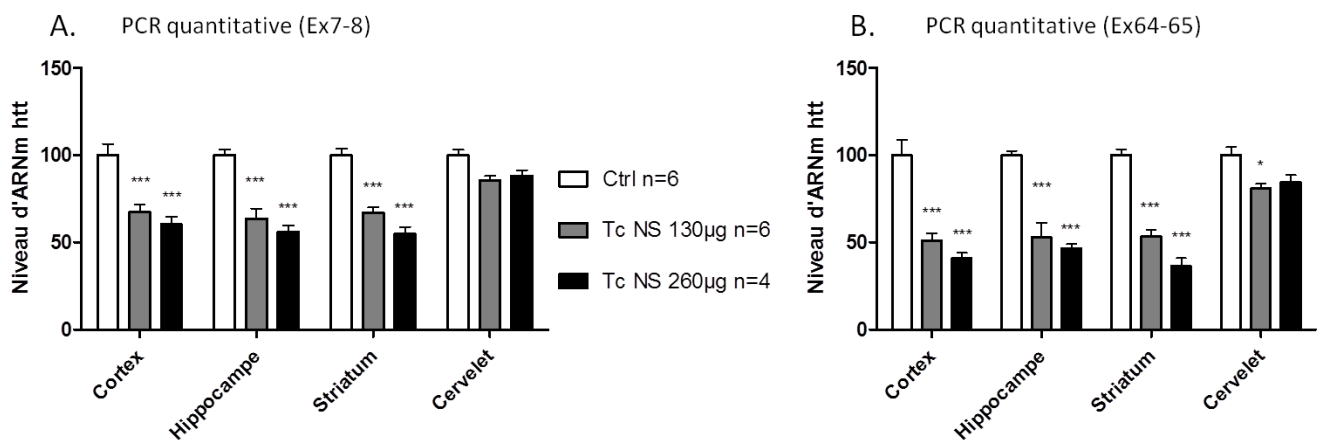
Ces résultats sont toutefois encourageants et le U7-CTG12 mérite d'être étudié de façon plus approfondie. Dans le temps limité qu'il me restait pour mon projet, la priorité a été donnée à l'évaluation *in vivo* de l'approche allèle non spécifique qui semblait la plus prometteuse.

## B. *Silencing* allèle non spécifique

### 1. Utilisation d'oligonucléotides antisens

Le Tc NS *gapmer* a démontré une très bonne efficacité en diminuant le niveau d'ARNm et de protéine HTT *in vitro*. Cet oligonucléotide a donc été injecté dans le ventricule latéral droit des souris YAC128, à deux doses différentes, 130 et 260 µg. De manière intéressante, ces deux doses ont été bien tolérées contrairement au Tc CTG qui s'est avéré toxique à de telles doses. Les animaux ont été sacrifiés 2 semaines après l'injection, et le cortex, l'hippocampe, le striatum ainsi que le cervelet ont été isolés pour évaluer l'efficacité du Tc NS.

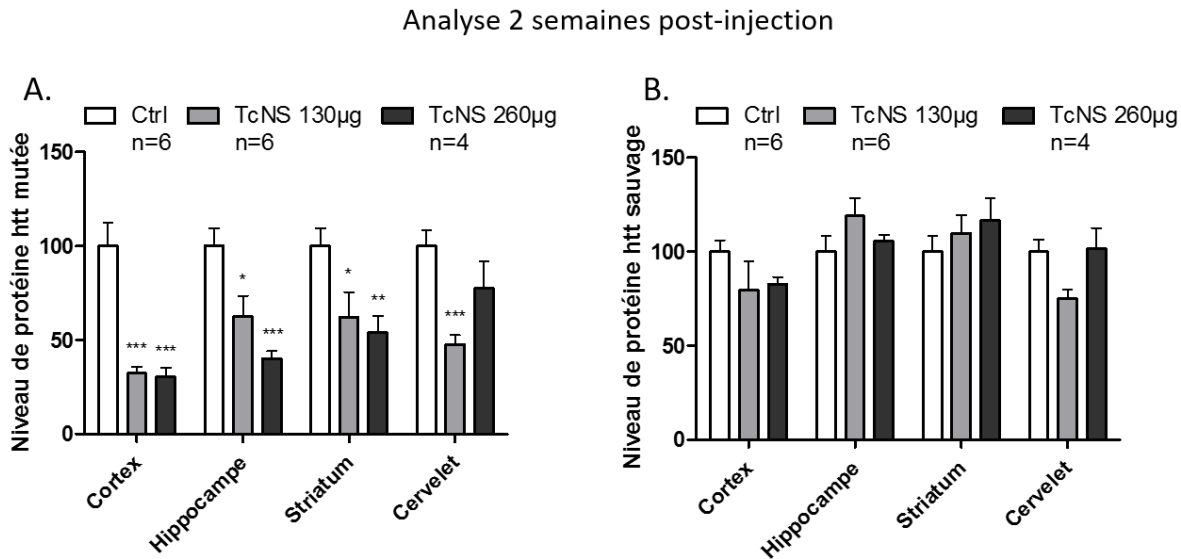
La **figure 45** présente les résultats de la PCR quantitative amplifiant la région entre les exons 7 et 8 (**figure 45A**) ou entre les exons 64 et 65 (**figure 45B**). Les résultats sont cohérents entre les 2 méthodes d'évaluation du niveau d'ARNm *HTT*, bien que la diminution semble encore plus marquée entre les exons 64 et 65. Le Tc NS induit une diminution de 40 à 60% dans le cortex, l'hippocampe, et le striatum. Cependant, dans le cervelet, le niveau d'ARNm *HTT* n'est pas significativement impacté.



**Figure 45 : Effet des ASO *gapmer* après injection ICV chez la souris YAC128 sur le niveau d'ARNm *HTT*.**

**A.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. **B.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=6 souris injectées avec du PBS, 6 souris injectées avec 130 µg de Tc NS et 4 avec 260 µg de Tc NS, 2 semaines après injection. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

La diminution de muHTT (**figure 46A**) a lieu principalement dans le cortex (baisse de 60 à 70%), mais également dans l'hippocampe et le striatum. Le cervelet est moins affecté, ce qui corrèle avec les résultats de qPCR. Le niveau de HTT sauvage murine n'est pas impacté car l'ASO est spécifique du *HTT* humain et ne reconnaît pas l'ARNm de la souris (**figure 46B**).

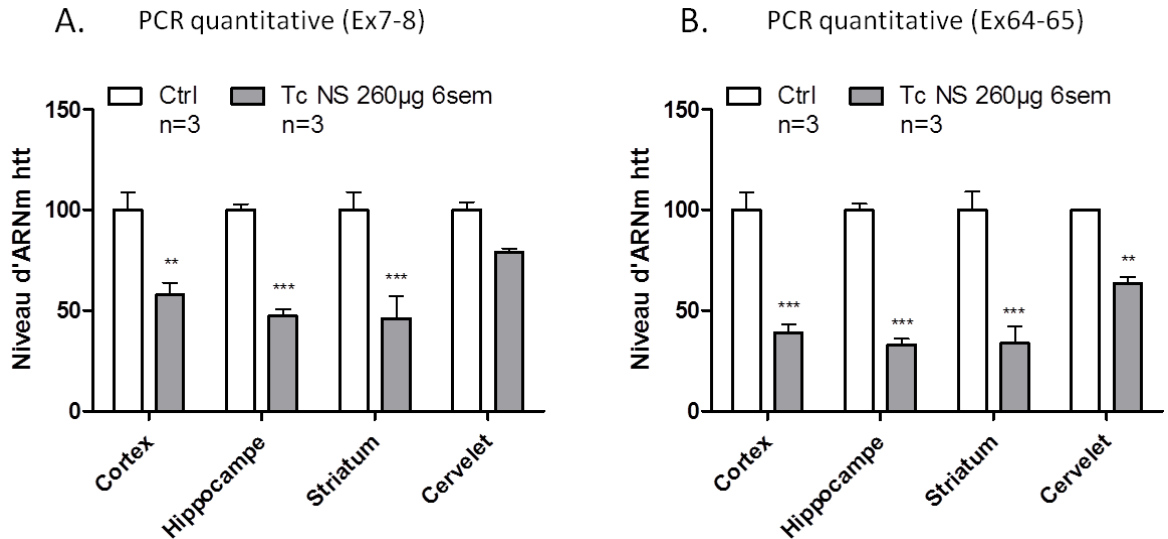


**Figure 46 : Effet des TcNS sur le niveau de HTT 2 semaines après injection ICV de souris YAC128.**

**A.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **B.** Quantification de HTT sauvage murine normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=6 souris injectées avec du PBS, 6 souris injectées avec 130µg de Tc NS et 4 souris injectées avec 260µg de Tc NS. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

La dose de 260 µg étant bien tolérée et ayant une très bonne efficacité, nous avons réalisé une cinétique en analysant les animaux 6 et 12 semaines après injection.

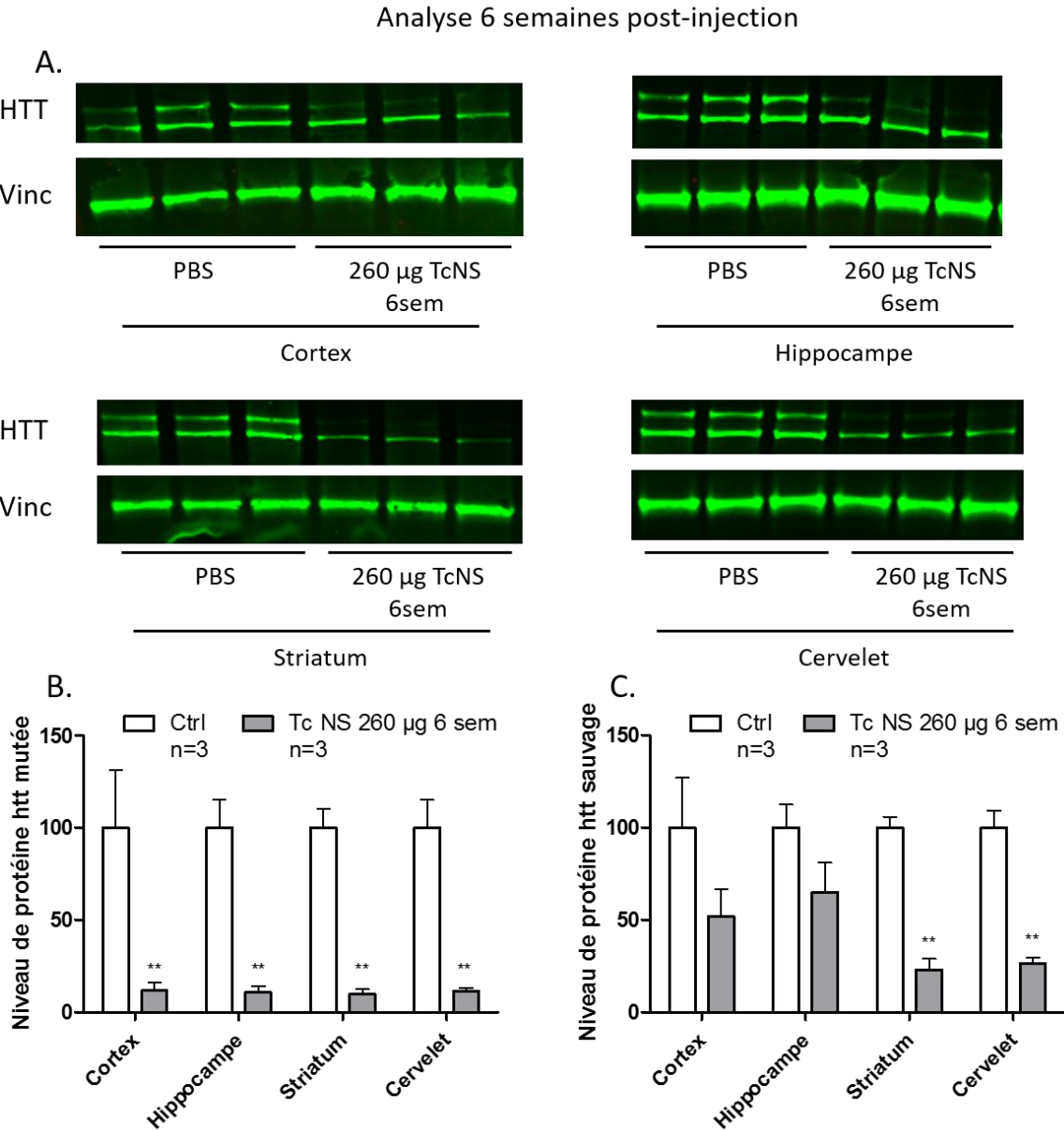
Six semaines après injection, le niveau d'ARNm *HTT* semble encore plus bas que 2 semaines après : entre 40 à 50% de diminution au niveau du cortex, de l'hippocampe et du striatum. L'effet au niveau du cervelet est également plus important (entre 20 et 40% de diminution) puisqu'il devient significatif (**figure 47**).



**Figure 47 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm *HTT* 6 semaines après injection ICV chez la souris YAC128.**

**A.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. **B.** Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$ , Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

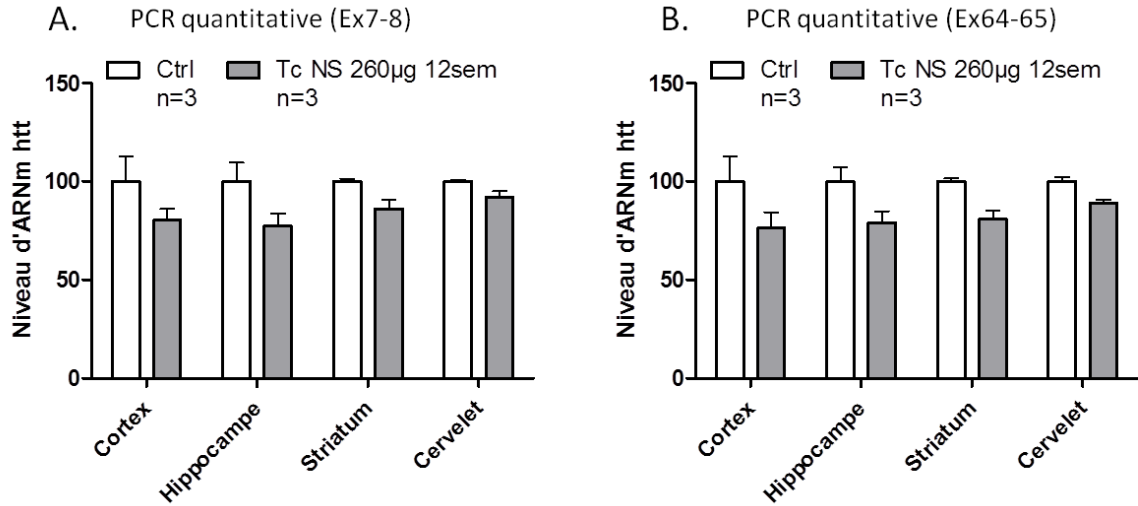
De la même manière, le niveau protéique 6 semaines après l'injection de Tc NS induit une forte diminution de muHTT, d'environ 90% (**Figure 48**). La huntingtine endogène murine semble également impactée dans le striatum et dans le cervelet.



**Figure 48 : Effet des TcNS sur le niveau de HTT 6 semaines après injection ICV de souris YAC128.**

**A.** Western blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT humaine et HTT sauvage murine dans les différentes structures cérébrales étudiées. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage murine normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=3 souris injectées avec du PBS et 3 souris injectées avec 260µg de Tc NS. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

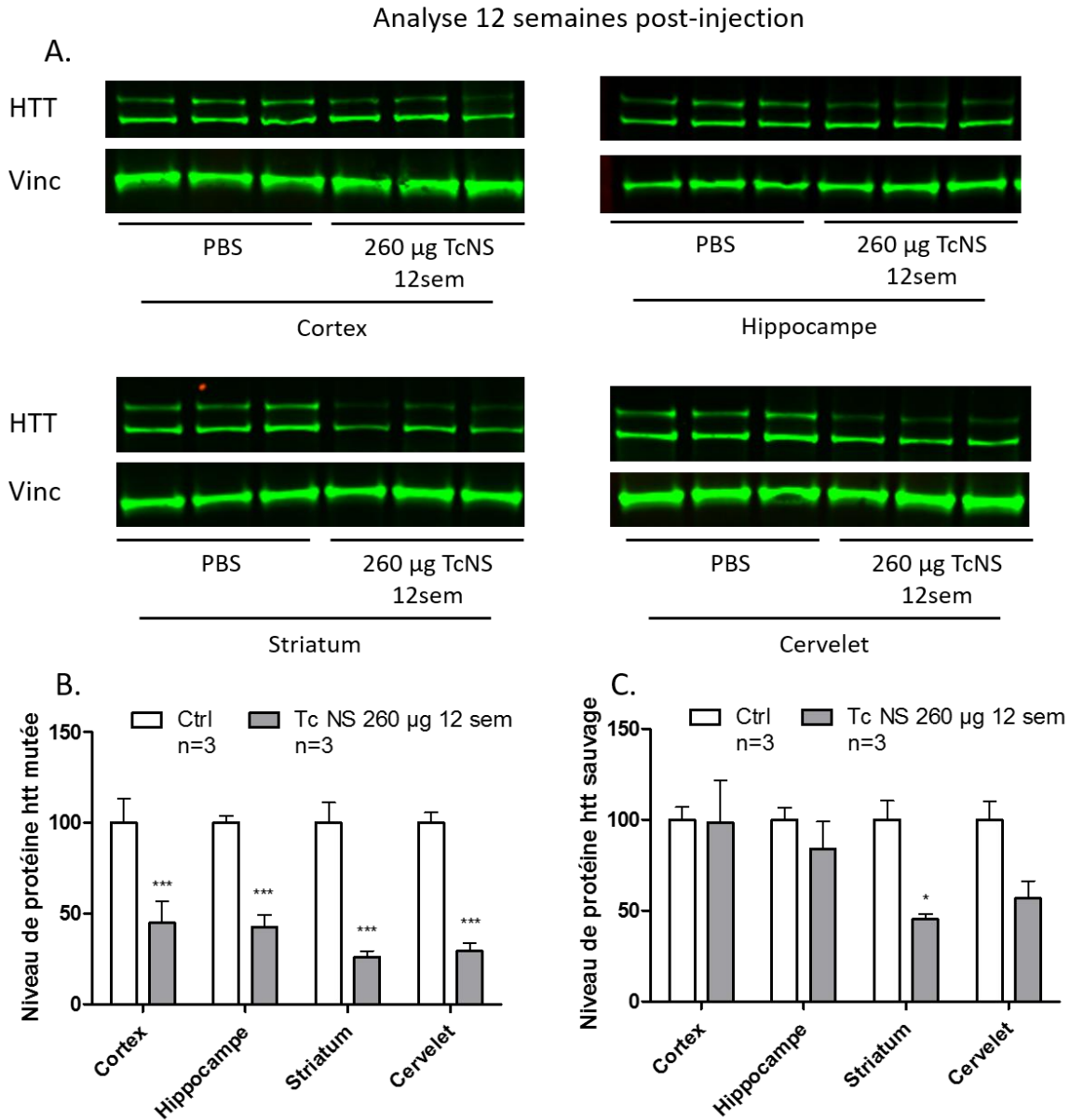
Cependant, 12 semaines après la fin du traitement, le niveau d'ARNm *HTT* est de retour à la normale dans l'ensemble du cerveau (**Figure 49**), alors que le niveau de muHTT est toujours très bas, à moins de 50% dans les différentes structures cérébrales étudiées (**Figure 50**).



**Figure 49 : Effet des *gapmer* ASO synthétiques sur le niveau d'ARNm *HTT* 12 semaines après injection ICV chez la souris YAC128.**

A. Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8. B. Résultats de la PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni, non significatif.

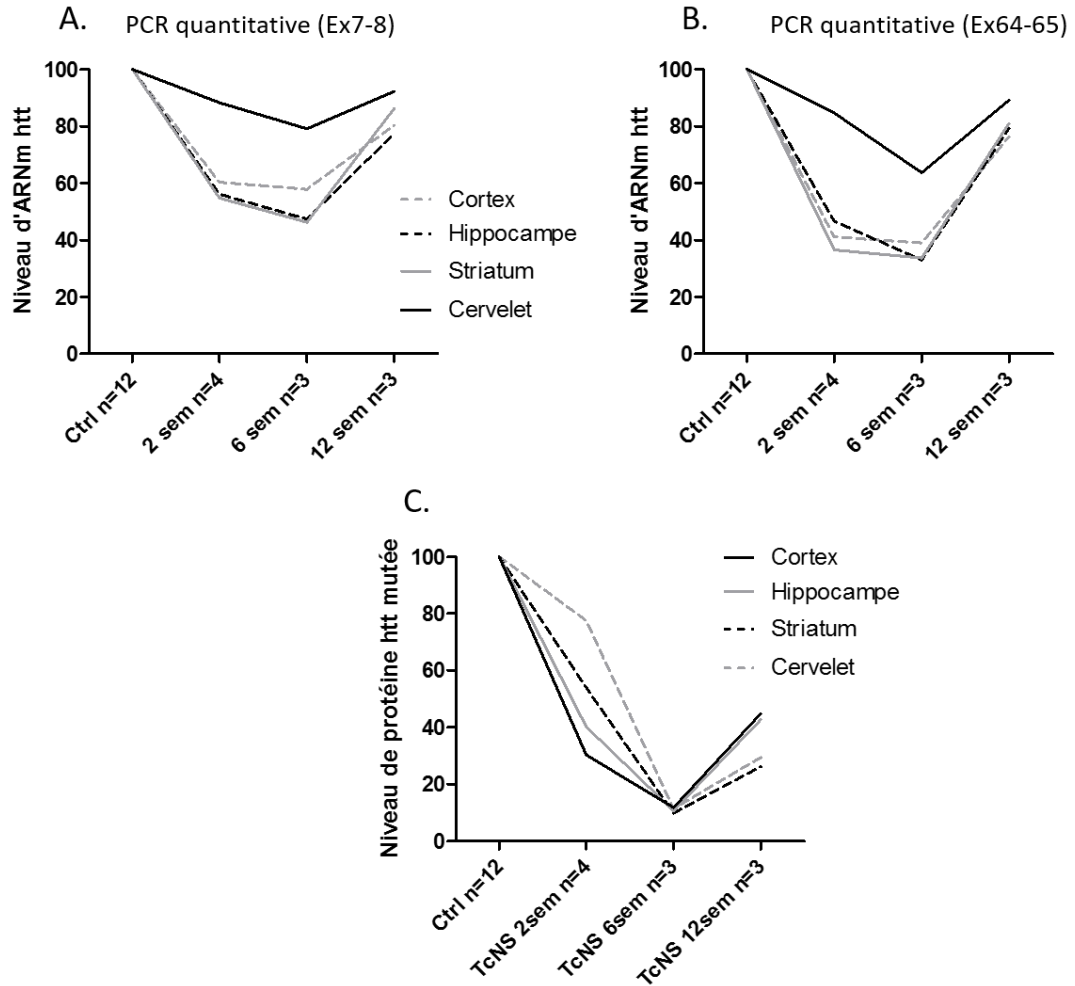




**Figure 50 : Effet des TcNS sur le niveau de HTT 12 semaines après injection ICV de souris YAC128.**

**A.** Western blot avec anticorps MAB2166 qui reconnaît muHTT humaine et HTT murine dans les différentes structures cérébrales étudiées. **B.** Quantification de muHTT normalisée par rapport à la vinculine. **C.** Quantification de HTT sauvage murine normalisée par rapport à la vinculine. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. n=3 souris injectées avec du PBS et 3 souris injectées avec 260µg de Tc NS. Les astérisques montrent une différence significative entre la condition traitée et la condition contrôle : \*p<0,05, \*\*p<0,01 et \*\*\*p<0,001, Test ANOVA à 2 facteurs, Bonferroni.

La **figure 51** récapitule ces derniers résultats et permet de suivre la cinétique de l'effet du TcNS sur le niveau d'ARNm *HTT* ainsi que sur le niveau protéique.



**Figure 51 : Durée du *silencing* induit par TcNS.**

**A.** Résultats de PCR quantitative réalisée entre les exons 7 et 8 des transcrits *HTT*. **B.** Résultats de PCR quantitative réalisée entre les exons 64 et 65 des transcrits *HTT*. **C.** Résultats de western blot permettant de quantifier le niveau de muHTT.





# Discussion

I.	Stratégie de saut d'exon .....	128
II.	<i>Silencing</i> allèle non spécifique .....	131
III.	<i>Silencing</i> allèle spécifique en ciblant les répétitions CAG .....	133
IV.	Les modèles animaux de la MH et leurs limitations .....	136
V.	Les biomarqueurs.....	137
VI.	TcDNA et AAV-U7snRNA : Avantages et inconvénients.....	138



Le laboratoire « Biothérapies des maladies du système neuromusculaire » dans lequel j'ai effectué ma thèse travaille sur des approches antisens pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne et l'amyotrophie spinale (Goyenvalle *et al.*, 2004, 2012, 2015 ; Robin *et al.*, 2017). Pour cela, les chercheurs de mon équipe utilisent une nouvelle chimie d'ASO, le TcDNA, et également une approche vectorisée, le système U7snRNA, afin de moduler l'épissage des différents gènes impliqués dans ces pathologies. Ils ont démontré la capacité de ces technologies à exclure ou ré-inclure un ou plusieurs exons, et ainsi souligné leur potentiel thérapeutique.

Le but de ma thèse a été de mettre en place et d'adapter ces approches antisens pour une maladie neurodégénérative monogénique, la maladie de Huntington. La première étape a consisté à mettre en place les outils selon les trois stratégies antisens choisies, à savoir le saut d'exon pour diminuer le clivage de HTT générant des fragments toxiques, le *silencing* allèle non spécifique pour diminuer le niveau global de HTT ainsi que le *silencing* allèle spécifique en ciblant les répétitions CAG pour diminuer uniquement le niveau de muHTT. Chacune des stratégies a dans un premier temps été évaluée *in vitro* après transfections d'ASO ou transductions de lentivirus-U7snRNA dans des fibroblastes provenant de patients atteints de la MH. Les analyses du niveau d'ARNm et de protéine HTT ont permis d'éliminer les molécules inefficaces et de sélectionner les molécules méritant d'être évaluées plus précisément *in vivo*. Nous allons revenir sur les résultats obtenus avec ces différentes stratégies et discuter des avantages et limitations de chacune.

### I. Stratégie de saut d'exon

Il a été démontré que le clivage de la huntingtine, notamment par la caspase 6 en position 586, est un phénomène important dans la pathogénicité de la MH (Graham *et al.*, 2006 ; Pouladi *et al.*, 2008). Etant donné qu'il existe trois sites de clivage au niveau des exons 12 et 13, le saut d'exon consistant à exclure ces exons pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Cette approche a préalablement démontré son efficacité à induire le saut partiel de l'exon 12 *in vitro* et *in vivo* à l'aide d'un 2'OMe ciblant l'exon 12 (Casaca-Carreira *et al.*, 2016; Evers *et al.*, 2014). Ce saut a ainsi permis d'enlever deux des trois sites de clivage présents dans cette région et de produire une protéine résistante à la caspase 6.

Nous avons tenté d'améliorer l'efficacité de ce saut d'exon, voire d'aboutir au saut total des exons 12 et 13 dans le but d'enlever les trois sites de clivage. Les TcDNA présentent essentiellement un avantage *in vivo* grâce à leur meilleure biodistribution, efficacité et durée de vie. Ainsi, pour les expériences *in vitro*, nous avons utilisés des 2'OMe pour sélectionner les séquences antisens capables d'induire un saut d'exon. Seule la séquence 12.3, préalablement décrite par Evers *et al.*, a été commandée également en TcDNA de 15 nucléotides. Les résultats montrent que l'efficacité est similaire entre le 2'OMe et le TcDNA (autour de 60%), confirmant ainsi la capacité des TcDNA de 15 nucléotides à moduler l'épissage aussi bien qu'un 2'OMe de 20 nucléotides. Les autres ASO ne permettent pas d'obtenir un saut d'exon efficace, même lorsque plusieurs séquences ont été co-transfectées. Le désavantage des co-transfections réside dans le fait que les deux ASO ne se retrouvent pas forcément au sein du même noyau. Ceci est d'autant plus vrai *in vivo* lorsqu'il est nécessaire d'injecter 2 ASO. Ainsi, l'utilisation des U7 « double cible » permet de contrer cette problématique en apportant les deux séquences antisens au sein du même noyau.

L'utilisation de U7snRNA modifiés pour cibler les exons 12 et 13 a ensuite été testée afin d'améliorer l'efficacité du saut d'exon. Sur les 7 constructions ciblant l'exon 12, une seule (LV-U7-12.3.4) permet le saut partiel de l'exon 12 avec une efficacité de 80%, ce qui est supérieur au 2'OMe préalablement décrit. Bien que n'éliminant que 2 sites de clivage, la construction U7-12.3.4 induisant le saut partiel de l'exon 12 a été sélectionnée pour être évaluée *in vivo* par la suite au sein du laboratoire.

L'étude de cette stratégie dans un modèle animal de la MH me semble en effet intéressante car il n'existe à l'heure actuelle que très peu de preuves de son efficacité *in vivo*. L'étude de Graham *et al.* nous indique qu'une mutation au niveau du site de clivage par la caspase 6 reverse le phénotype. Cependant, les études d'Evers *et al.* et de Casaca-Carreira *et al.*, qui permettent de démontrer la faisabilité de ce saut d'exon *in vitro* et *in vivo*, ne donnent pas d'informations concernant la fonctionnalité de la protéine HTT tronquée ( $\Delta$ Ex12 partiel). Il est important de noter que cette stratégie de saut d'exon est récente et que l'étude du phénotype moteur et comportemental des souris MH avant et après traitement est probablement déjà en cours. Il serait donc très intéressant d'injecter un AAV contenant l'U7-12.3.4 (déjà produit) et de réaliser des tests moteurs et comportementaux.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons réalisé uniquement des constructions U7 « double cible » où les deux séquences reconnaissent le même exon (soit l'exon 12, soit l'exon 13). Il pourrait être également intéressant de réaliser des U7 qui ciblent à la fois l'exon 12 et l'exon 13, comme par exemple la séquence 12.3 et le site donneur de l'exon 13 (U7-12.3/13DS). Etant donné la petite taille de la cassette U7, il pourrait aussi être possible de placer deux cassettes U7 dans un même vecteur AAV, comme cela a déjà été fait pour DMD afin d'induire un saut d'exons multiple (Goyenvalle *et al.*, 2012b).

Ainsi, la stratégie de saut d'exon permettant d'éliminer les sites de clivage de HTT semble une approche prometteuse, surtout qu'une étude récente suggère également la toxicité du fragment C-terminal, en plus de celle déjà décrite du fragment N-terminal (El-Daher *et al.*, 2015). Cependant, une autre étude montre que la suppression génétique de la caspase 6 chez *HdhQ150* n'a pas d'effet sur la protéolyse de HTT (Landles *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur cette approche afin de répondre aux nombreuses questions qui restent en suspens, comme l'efficacité de ces molécules *in vivo* et leur capacité à réverser le phénotype ou encore la quantité de saut d'exon requise pour obtenir un potentiel effet thérapeutique.

D'autre part, les deux U7snRNA ciblant l'exon 13 induisent un saut de cet exon de 30 à 60%. Cependant, ce saut d'exon n'est pas souhaitable dans le cadre de cette stratégie puisque cela entraînerait un décalage du cadre de lecture. Seuls le saut partiel de l'exon 12 et le saut total des exons 12 et 13 auraient permis de conserver le cadre de lecture et donc de générer une protéine HTT sans sites de clivage. Les deux constructions citées précédemment n'ont donc pas été sélectionnées pour la stratégie de saut d'exon visant à éliminer les sites de coupure. Cependant, ces U7 ont tout de même été produits en AAV pour l'exploration d'une autre approche *in vivo* : le saut d'exon qui induit un décalage du cadre de lecture afin de réaliser un *silencing* allèle non spécifique de HTT. Il serait donc intéressant d'injecter ces AAV et de regarder l'effet sur la quantité de muHTT et de HTT, afin de comparer ces molécules notamment avec le TcNS qui entraîne lui aussi un *silencing* allèle non spécifique.



## II. *Silencing* allèle non spécifique

L'utilisation d'ASO *gapmer* permet de réguler l'expression d'un gène en dégradant l'ARNm cible par action de la RNase H. Ainsi, Kordasiewicz *et al.* ont démontré l'efficacité d'un 2'MOE *gapmer* de 20 nucléotides (5-10-5) qui reconnaît l'exon 36 de *HTT* (Kordasiewicz *et al.*, 2012). Les travaux présentés dans cette thèse démontrent l'efficacité d'un *gapmer* TcDNA de 15 nucléotides (4-7-4), ciblant la même région, à induire une diminution significative du niveau d'ARNm et de protéine HTT dans différentes lignées de fibroblastes. Deux et six semaines après une injection de 260µg de TcNS en ICV, nous observons une baisse de l'ARNm *HTT* autour de 50% dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées, à l'exception du cervelet où la diminution est plus légère. Le niveau de protéine HTT est lui aussi diminué, avec un niveau particulièrement bas 6 semaines après injection, autour de 80%, même dans le cervelet. De manière intéressante, alors que le niveau de transcrits *HTT* revient à des valeurs basales 12 semaines après injection, le niveau de protéine HTT reste bas, avec une diminution d'environ 60 à 70%. Ce décalage entre le niveau d'ARNm *HTT* et de protéine HTT est probablement dû à la demi-vie de la protéine qui doit être plus longue que celle du transcrit. Il serait intéressant de continuer cette cinétique afin d'observer le temps nécessaire pour un retour à un niveau basal de la protéine après une injection de Tc NS. D'autre part, des analyses de biodistribution sont en cours au laboratoire pour potentiellement expliquer les différences d'efficacité entre les structures cérébrales.

La précédente étude utilisant le 2'MOE démontrait un retour à la normale du niveau d'ARNm et de protéine HTT 16 semaines après infusion de l'ASO en ICV à 50µg/jour pendant 2 semaines (Kordasiewicz *et al.*, 2012). Cela correspond donc à une dose cumulée de 700 µg, ce qui est bien plus que ce que nous avons injecté en TcNS. D'autre part, ils obtiennent une amélioration du phénotype qui dure pendant plus de 9 mois, soit 5 mois après le retour à un niveau de base de la protéine HTT. Ce phénomène a ainsi été nommé « *Huntingtin holiday* » par certains chercheurs pour illustrer le fait que la suppression transitoire de muHTT « remettrait à zéro l'horloge de la MH », et que les espèces toxiques prendraient des semaines voire des mois à se reformer (Lu et Yang, 2012).

Il serait alors intéressant d'analyser le phénotype des souris traitées avec le TcNS afin de voir si les améliorations sont encore plus remarquables avec cette molécule qu'avec le 2'MOE. Nous pourrions alors faire des tests moteurs et comportementaux après une seule injection

ICV, mais également après infusion de TcNS à 50µg/jour afin de comparer l'efficacité de cet ASO à celui préalablement décrit. D'autre part, étant donné la capacité des TcDNA à traverser la barrière hémato-encéphalique, il serait intéressant d'injecter le TcNS par voie systémique et de regarder l'effet au niveau cérébral. Cela pourrait potentiellement soigner aussi les troubles périphériques observés chez les patients MH. En effet, la perte de poids, l'atrophie des muscles squelettiques et l'augmentation de l'activation du système immunitaire impactent la qualité de vie des patients. L'interaction entre le SNC et la périphérie reste relativement mal comprise. Cependant, il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires libérées par les monocytes peuvent traverser la BHE, ce qui exacerbe l'inflammation due à la neurodégénérescence (Carroll *et al.*, 2015). En effet, la réponse inflammatoire est potentialisée dans les monocytes exprimant muHTT, et le *silencing* de HTT dans les monocytes entraîne une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires. De plus, il semblerait que les changements induits uniquement en périphérie affectent aussi le SNC et modifient le cours de la maladie. Ainsi, on pourrait imaginer qu'une diminution de l'expression de muHTT en périphérie améliore les symptômes périphériques et centraux. Bien entendu, des études sont nécessaires pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, et le niveau de diminution de HTT devra être contrôlé pour ne pas induire d'effets secondaires dûs au *silencing* partiel de la huntingtine sauvage.

Une étude clinique est actuellement en cours avec le 2<sup>MOE</sup> et permettra ainsi de répondre à des questions essentielles, comme la dose d'ASO nécessaire pour induire un effet thérapeutique, mais aussi et surtout de déterminer à quel point la diminution de la protéine sauvage est tolérée chez les patients. En effet, la physiopathologie de la MH n'est pas encore très bien comprise et les chercheurs ne sont pas unanimes sur la cause, à savoir un gain de fonction toxique de muHTT ou une perte de fonction de HTT sauvage. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe des preuves supportant les deux hypothèses, il est donc très probable que HTT subisse à la fois une perte et un gain de fonction. Ainsi, il faut être prudent quant aux thérapies envisagées pour cette pathologie, et étant donné que HTT a de nombreuses fonctions dans la cellule, il est important de contrôler l'impact du *silencing* allèle non spécifique sur l'organisme. Une étude récente a notamment montré que le KO de HTT à 8 mois n'est pas délétère pour la souris (Yang *et al.*, 2017). Il serait donc vraiment

intéressant de regarder l'effet sur l'organisme de la diminution de HTT total après injections ICV et IV à différents âges.

Afin de s'affranchir de ce problème, les chercheurs ont essayé de mettre en place des stratégies davantage spécifiques de muHTT. Ainsi, après avoir identifié des SNP associés à la MH, ils ont utilisé des ASO *gapmer* ciblant ces SNP de façon à ce que la molécule antisens ne puisse se fixer que sur l'allèle muté. Différentes études décrites dans l'introduction se basent sur cette approche de médecine personnalisée. Le désavantage de cette stratégie est que tous les patients MH ne pourront pas être soignés avec un seul et même ASO. Il sera alors nécessaire de développer plusieurs molécules en clinique, puis de connaître les SNP de chaque patient afin d'administrer la bonne molécule.

Une approche alternative permettant de cibler tout de même préférentiellement l'allèle muté consiste à cibler les répétitions CAG.

### III. *Silencing allèle spécifique en ciblant les répétitions CAG*

Comme je l'ai montré au cours de ce projet, l'utilisation de Tc CTG de 15 nucléotides, qui recouvre donc 5 répétitions CAG, induit *in vitro* une diminution du niveau protéique de HTT. Cette baisse est relativement spécifique puisque le niveau de muHTT est impacté de 60%, contre 30% pour HTT sauvage. Le niveau d'ARNm *HTT* a été, dans un premier temps, évalué par RT-PCR permettant d'amplifier les répétitions CAG pour distinguer l'allèle muté de l'allèle sauvage. Ces résultats semblaient suggérer une diminution pratiquement totale du niveau d'ARNm *HTT* suite à la transfection de Tc CTG. Ceci est surprenant étant donné que le Tc CTG est entièrement modifié et ne doit donc pas induire de dégradation de l'ARNm par RNase H. Nous pensions que l'ASO allait induire un blocage de la traduction, et donc diminuer la quantité de HTT sans impacter le niveau de transcrits. Nous avons alors remis en question le mode d'action de l'ASO, conforté par les travaux d'Evers *et al.* qui utilisent un 2'OMe complètement modifié et qui montrent également une forte diminution de l'ARNm, sans pour autant en expliquer le mécanisme (Evers *et al.*, 2011). Cela nous a alors conduits à mettre au point d'autres PCR, en aval des répétitions CAG, qui n'ont montré aucune diminution des transcrits *HTT*. Cela a été confirmé par deux qPCR au niveau des exons 7-8 et 64-65. Le Tc CTG n'aurait donc pas d'impact réel sur les niveaux d'ARNm *HTT* et les observations de la RT-PCR autour des répétitions CAG seraient plutôt artéfactuelles. L'une

des explications possibles serait que le Tc CTG soit encore présent après extraction d'ARN, hybridé au niveau des répétitions CAG de *HTT* empêchant ainsi l'amplification de cette région (soit lors de la reverse transcription, soit lors de la PCR). Nous tentons d'ailleurs actuellement de vérifier cette hypothèse en ajoutant le TcDNA dans des échantillons contrôles avant ou après la reverse transcription.

L'évaluation *in vivo* de cette molécule conduit à des résultats plus hétérogènes. Il n'y a effectivement pas d'effet sur la quantité d'ARNm *HTT* d'après les résultats obtenus par qPCR, mais il est plus difficile de conclure sur la quantité de protéine HTT. Cela s'explique tout d'abord par une variabilité au sein des souris injectées avec du PBS, mais aussi par une différence de réponse chez les animaux traités : par exemple, 1 seule souris sur les 4 traitées avec 50µg de Tc CTG semble réellement présenter une diminution de muHTT. Cette diminution est relativement spécifique de la forme mutée car la forme sauvage n'est pratiquement pas impactée.

De la même façon, il a été montré ici que l'utilisation de U7snRNA ciblant 12 CAG semble induire une diminution de la quantité de muHTT *in vitro* et *in vivo*, selon le même processus. Les résultats *in vivo* sont encore difficiles à interpréter à cause d'une grande variabilité inter-individuelle. Il serait ainsi intéressant pour l'évaluation de l'AAV-U7-CTG19 d'augmenter le nombre de souris injectées avec du PBS pour pouvoir réellement conclure sur l'efficacité de cette stratégie.

D'autre part, une étude très récente montre l'utilisation d'ASO capables de se lier directement à l'ADN afin de diminuer à la fois le transcrit *muHTT* et la protéine mutée (Zaghloul *et al.*, 2017). Pour cela, les auteurs ont utilisé un mix de nucléotides non-modifiés et de LNA, de différentes tailles, avec des liens PO ou PS. Ce sont des CAG, qui vont donc reconnaître le brin matrice du gène *HTT*. Les LNA/ADN PS démontrent une très bonne capacité à diminuer la quantité d'ARNm et de protéines HTT *in vitro*, via une inhibition de la transcription, alors que le PO a une efficacité beaucoup plus faible. Ils démontrent d'ailleurs une localisation nucléaire des PS, et cytoplasmique des PO, ce qui pourrait expliquer cet effet. De manière intéressante, les ASO d'une longueur comprise entre 12 et 18 nucléotides induisent une diminution similaire du niveau d'ARNm HTT (autour de 60%), alors que le

LNA/DNA PS de 10 nucléotides abolit totalement cet effet. Cette stratégie est actuellement en cours d'évaluation dans mon laboratoire avec un TcDNA-CAG de 15 nucléotides.

L'avantage de ces approches ciblant les répétitions CAG, si elles fonctionnent, est la possibilité de traiter tous les patients atteints de la MH avec une même molécule, contrairement à la stratégie basée sur les SNP. De plus, cette approche est plus sûre pour son adaptation en clinique puisqu'elle conserve le niveau de HTT sauvage, à l'inverse de l'approche allèle non spécifique décrite précédemment. Cependant, le génome humain comprend un nombre important de gènes contenant des répétitions CAG. Les protéines codées par ces gènes peuvent avoir un rôle essentiel pour la cellule, c'est pourquoi il est important que les ASO n'interfèrent pas dans l'expression de ces protéines. Comme décrit dans l'introduction, les travaux menés par l'équipe du Pr. Corey montrent que le PNA de 19 nucléotides n'affecte pas le niveau protéique de TBP, ATN1 et FOXP2 qui contiennent des répétitions de glutamines (Hu *et al.*, 2009a). Comme le montre Sun *et al.*, les effets *off target* dépendent bien évidemment de la concentration de l'ASO et de sa séquence (Sun *et al.*, 2014). Par exemple, le PMO-CTG22 induit une diminution de l'expression d'ATXN3, alors que ce n'est pas le cas avec les PMO-CTG25 et CTG28. Il faut donc rester prudent quant aux effets *off target* de ces molécules, notamment pour le Tc CTG qui ne fait que 15 nucléotides de long. Il serait aussi intéressant de comparer sa spécificité avec celle de l'AAV-U7-CTG12, étant donné que ce dernier permet de cibler 12 CTG, soit une longueur totale de 36 nucléotides.

Il est d'ailleurs intéressant de noter que le PMO-CTG22, le plus court, inhibe l'expression protéique de HTT, de manière allèle non spécifique (Sun *et al.*, 2014). De plus, la spécificité est d'autant plus marquée que le delta entre le nombre de répétitions de l'allèle muté et de l'allèle sauvage est grand. Le mécanisme selon lequel les ASO reconnaissent davantage l'allèle muté n'est pas totalement élucidé, mais cela fait intervenir non seulement le nombre de répétitions CAG, mais aussi la structure 3D de l'ARN qui facilite probablement la liaison des ASO. C'est d'ailleurs certainement l'une des raisons permettant d'expliquer le peu d'effets *off target* observés (ou du moins décrits).

Enfin, il est important de noter que la MH fait partie des maladies par expansion de polyglutamine, toutes causées par des répétitions CAG. Ces molécules pourraient donc

également être testées sur des modèles cellulaires et murins d'autres pathologies, comme l'ataxie spino-cérébelleuse qui est causée par une expansion des répétitions CAG au sein du gène *ATXN3*. Par exemple, le PNA de 19 nucléotides décrit par l'équipe du Pr. Corey a la capacité de diminuer *in vitro* l'expression de l'ataxine 3 mutée spécifiquement, de la même façon que pour la huntingtine (Hu *et al.*, 2009a). Des fibroblastes dérivés de patients atteints de cette ataxie pourraient être cultivés dans notre laboratoire, afin de tester les molécules ciblant les répétitions CAG sur les lignées HTT en parallèle des lignées *ATXN3*.

#### IV. Les modèles animaux de la MH et leurs limitations

Les modèles murins de la MH ont, pour la plupart, un nombre de répétitions CAG très important (plus de 100 CAG) alors que les patients présentent en moyenne une cinquantaine de répétitions. Ces formes s'apparient davantage à des formes juvéniles, beaucoup plus sévères. Ainsi, l'évaluation d'approche allèle spécifique en ciblant les répétitions CAG pourrait par exemple s'avérer bénéfique et très spécifique de muHTT dans un modèle murin contenant plus de 100 répétitions CAG, alors que cela ne serait pas le cas chez un patient présentant 20 et 40 répétitions où les deux allèles sont plus difficiles à discriminer. Il est donc important de conserver les études *in vitro* qui permettent de se placer dans un contexte plus proche de ce qui est observé chez les patients pour lesquels les répétitions sont de plus petites tailles.

L'une des raisons à l'origine du nombre très important de répétitions CAG chez les modèles animaux est d'exacerber la pathologie pour obtenir un phénotype plus marqué. Par exemple, la souris R6/2 a un phénotype très sévère avec une durée de vie réduite. Ainsi, même si cette souris ne contient que le fragment N-terminal de HTT, il est plus facile de conclure sur l'efficacité d'une molécule en regardant par exemple sa capacité à allonger la durée de vie des souris. A l'inverse, la souris YAC128 utilisée dans ces travaux développe un phénotype entre 6 à 9 mois, ce qui est assez tardif avec de plus, des déficits assez peu marqués. Dans le cadre de mon étude qui vise à évaluer le potentiel thérapeutique de molécules antisens qui ciblent les exons 1, 12, 13 et 36, la souris R6/2 n'était pas éligible. Cependant, il serait intéressant de tester les molécules ciblant les répétitions CAG sur ce modèle afin d'évaluer leur capacité à réverser le phénotype sévère de la R6/2 et à augmenter leur durée de vie.

D'autre part, la plupart des souris transgéniques contiennent en plus le gène *Hdh* codant pour la forme murine de HTT. Cela ne permet donc pas d'étudier la bonne tolérance des stratégies de *silencing* allèle non spécifique par exemple, puisque la forme HTT murine endogène prend le relais. Les souris Hu97/18 et Hu128/21 semblent être un bon compromis car elles contiennent uniquement les deux allèles *HTT* humain, sans la présence de son homologue murin (Southwell *et al.*, 2013, 2017). Ces souches ne sont, à ma connaissance, pas encore commercialisées mais pourrait répondre aux questions concernant la quantité de HTT sauvage nécessaire à l'organisme.

Il faut donc garder en mémoire que les modèles murins de la MH ne sont pas parfaits, mais participent tout de même à l'avancement de la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la pathologie, ainsi qu'à l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques.

## V. Les biomarqueurs

Dans cette étude, la quantité de muHTT a été déterminée uniquement par western blot. Il serait nécessaire de mettre en place d'autres techniques d'évaluation, comme des immunohistochimies permettant de détecter les agrégats de muHTT. De plus, il serait intéressant de réaliser du TR-FRET (Time-resolved Förster resonance energy transfer) en collaboration avec Novartis (Baldo *et al.*, 2012 ; Weiss *et al.*, 2009) afin de pouvoir quantifier muHTT soluble et muHTT agrégée.

D'autre part, le laboratoire du Dr. Perrier à iStem met au point un test AlphaLISA capable de détecter de façon spécifique muHTT dans des neurones striataux et des astrocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines provenant de patients (Communication personnelle de Julie Bigarreau, JED 2016). Nous avons par conséquent initié une collaboration afin de tester les différentes molécules antisens dans ce système de criblage *in vitro*.

La grande difficulté de la MH, comme pour beaucoup d'autres pathologies, est de trouver des biomarqueurs sensibles qui permettent réellement de déterminer si un traitement fonctionne ou non. Le manque de biomarqueurs est à la fois visible dans les études de recherche en laboratoire universitaire mais également dans les études pré-cliniques et

cliniques où les molécules échouent souvent faute d'efficacité. Il est alors difficile de savoir si la molécule est réellement inefficace ou si les modalités de l'essai clinique, tels que les critères d'inclusion des patients dans l'essai et les paramètres mesurés, ont été mal décidées.

Comme nous l'avons précédemment discuté, les modèles animaux présentent des phénotypes variables et généralement assez peu marqués. Ainsi, de nombreuses études s'attèlent à évaluer d'autres paramètres qui pourraient être objectivement mesurés et reflèteraient avec certitude la réponse au traitement. Certains biomarqueurs relèvent de la clinique, avec une évaluation directe des patients qui, sur une échelle établie, peuvent mesurer leur capacité à faire telle ou telle action. D'autres biomarqueurs concernent des techniques d'imagerie cérébrale et sont là encore difficiles voire impossibles à mettre en place sur des modèles animaux en laboratoire. Les biomarqueurs biochimiques sont donc les plus utilisés ; ils sont notamment dosés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sang (Andre *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant de mettre en place le prélèvement de LCR au laboratoire afin d'étudier les différents biomarqueurs décrits dans le LCR et dans le sang.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés à certains biomarqueurs des fibroblastes décrits par une équipe italienne, afin d'avoir une autre mesure permettant de conclure quant à l'efficacité des outils thérapeutiques testés (Marchina *et al.*, 2014). Malheureusement, nous n'avons pas retrouvé de surexpression dans les lignées provenant de patients atteints de la MH en comparaison à la lignée sauvage. Cela s'explique, entre autres, par une variabilité très forte de l'expression de ces gènes au cours du temps dans la lignée sauvage.

## VI. TcDNA et AAV-U7snRNA : avantages et inconvénients

L'objectif de ma thèse était d'évaluer trois approches antisens connues et préalablement validées en utilisant deux nouveaux outils maîtrisés et développés au sein de mon laboratoire : une nouvelle chimie d'ASO synthétiques, le TcDNA, et une approche vectorisée utilisant le système U7snRNA. Nous allons donc discuter des avantages et des inconvénients de ces deux outils en s'appuyant sur les résultats obtenus au cours de ma thèse, ainsi que sur les études menées par mon laboratoire sur d'autres pathologies.



De par sa structure contrainte, le TcDNA a la propriété d'être très affiné pour son messenger cible. Alors que les chimies classiques contiennent le plus souvent une vingtaine de nucléotides, le TcDNA en contient généralement 15, et est également efficace à 13 nucléotides (Relizani *et al.*, 2017). Cela offre l'avantage de diminuer les coûts de production, mais également de réduire la masse de nucléotides synthétiques injectés tout en conservant l'effet biologique (Goyenvalle *et al.*, 2016). Cependant, en diminuant la taille de l'ASO, il faut être d'autant plus vigilant concernant les effets *off target*, comme évoqué précédemment.

En travaillant sur DMD et SMA, mon équipe a démontré l'efficacité supérieure des TcDNA par rapport aux chimies classiques pour moduler l'épissage (Goyenvalle *et al.*, 2015 ; Robin *et al.*, 2017). Ces travaux ont également prouvé leur capacité à traverser la BHE après injections intraveineuses et sous-cutanées (Goyenvalle *et al.*, 2015, 2016 ; Robin *et al.*, 2017). Le mécanisme selon lequel le TcDNA est plus efficace est encore incompris, même si l'on sait qu'il est très stable, avec une biodistribution très large qui peut même atteindre le SNC. De plus, les TcDNA sont capables de former des nanoparticules spontanément (Ezzat *et al.*, 2015 ; Goyenvalle *et al.*, 2015), ce qui pourrait imiter les agents transfectants et donc augmenter l'assimilation de l'ASO par les cellules. Une autre hypothèse serait que les TcDNA se lient naturellement à des protéines qui leur permettent d'être transportés et de passer les barrières endothéliales (Goyenvalle *et al.*, 2016). Une partie de l'équipe s'attèle à identifier les protéines qui se lient au TcDNA afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui conduisent à cette efficacité.

D'autre part, il est également possible de conjuguer les TcDNA à des molécules amphiphiles, comme les acides gras ou le cholestérol. L'ajout de ces molécules permet d'augmenter la pénétration des ASO dans la cellule, et leur biodistribution générale après injection systémique (travaux en cours, non publiés). Il faut garder en mémoire que lorsqu'une séquence a par exemple la capacité de moduler l'épissage, alors il est possible d'optimiser cette séquence en faisant varier sa taille, sa composition en PO/PS, les modifications chimiques des nucléotides, l'ajout de molécules permettant l'entrée dans les cellules etc... Il en est de même pour les U7snRNA. Même s'il n'est pas possible d'agir sur les mêmes paramètres, le type de vecteur viral (AAV ou lentivirus) ou le sérotype peut être modifié afin de moduler le tropisme et le type cellulaire impacté.

L'une des limitations des thérapies antisens est la distribution au sein de l'organe cible. Cela est bien sûr dépendant du mode d'administration. Dans le cadre de la MH, les molécules antisens sont injectées en local, directement dans le LCR par voie ICV ou intrathécale. L'AAV2/9 utilisé dans cette étude a l'avantage de transduire les cellules neuronales et les astrocytes de différentes structures comme le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Donsante *et al.*, 2016). Les ASO ont la capacité de diffuser relativement bien au sein des structures cérébrales après une injection ICV (Casaca-Carreira *et al.*, 2017 ; Geary *et al.*, 2015). Il serait intéressant de comparer la biodistribution des chimies classiques avec celle des TcDNA, afin de documenter au mieux les propriétés de cette nouvelle chimie. Ces études sont actuellement en cours au sein du laboratoire. Il est important de garder en mémoire que l'on peut aussi influencer la biodistribution en optimisant le protocole opératoire, à savoir la quantité de particules injectées, la vitesse et le volume d'injection.

L'un des autres inconvénients des ASO est l'effet transitoire de ces molécules, qui vont être métabolisées après quelques semaines ou quelques mois. Il est donc nécessaire de ré-injecter plusieurs fois le patient au cours de sa vie, ce qui est problématique notamment dans le cas de modes d'injections invasifs (type intrathécale). Le gros avantage du système vectorisé est que l'on obtient un effet à long terme, nécessitant peu (ou potentiellement pas) de ré-administration. Cependant, cette propriété peut se révéler limitante aux yeux des instances réglementaires car non réversible, contrairement à l'effet des ASO.

L'inconvénient des vecteurs viraux comme les AAV est d'une part leur faible capacité d'encapsulation, limitant donc la taille des transgènes envisageables. Cela n'est pas un problème dans notre cas étant donné que le U7snRNA est petit, il est même possible d'en mettre plusieurs dans un même vecteur ! D'autre part, le génome des AAV étant maintenu sous forme épisomale (et non intégré dans le génome comme pour les vecteurs lentiviraux), leur effet à long terme ne sera garanti que dans des cellules quiescentes, ce qui n'est pas dérangeant lorsque l'on s'intéresse à des cellules neuronales comme c'est le cas ici.

D'autre part, une grande partie de la population produit des anticorps neutralisants dirigés contre certains sérotypes d'AAV. Là encore, cela ne pose pas de problème dans notre étude puisque nous tirons avantage du cerveau qui est une zone de l'organisme relativement isolée. Cet espace protégé est également favorable pour l'ASO, où la toxicité est moindre

que lorsque l'on injecte directement par voie systémique. Il est intéressant de noter que le Tc NS a pu être injecté en ICV à deux doses différentes, 130 et 260 µg, alors que ces doses se sont avérées toxiques pour le Tc CTG. Cela peut s'expliquer par le nombre de nucléotides modifiés dans les ASO : Tc CTG contient 15 nucléotides modifiés alors que le Tc NS est un *gapmer* qui n'en contient donc que 8. Cela suggère donc que les modifications Tc sur les nucléotides entraînent une certaine toxicité, mais cela reste relatif en comparaison à celle induite par les 2'OMe (communication personnelle de Willeke Van Roon-Mom). Nous avons d'ailleurs nous-même expérimenté la toxicité de cette chimie en injectant le 2'O NS à une dose équimolaire au Tc NS. Les souris n'ont pas survécu à 330 et 165 µg de 2'O NS.

Dans un souci de temps, nous avons donné la priorité à la stratégie de *silencing* allèle non spécifique, qui ne peut pas être vectorisée puisqu'elle nécessite un ASO *gapmer* pour activer la RNase H. Cependant, les U7snRNA capables d'induire le saut de l'exon 13, qui induirait un décalage du cadre de lecture, pourraient conduire à un *silencing* allèle non spécifique. Il serait donc intéressant d'étudier cette stratégie *in vivo* afin de comparer une approche allèle non spécifique vectorisée aux ASO *gapmer*.

Une question importante reste l'efficacité minimum suffisante *in vivo*. L'inhibition complète de l'expression de muHTT n'est pas nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique, tout comme l'inhibition partielle de HTT sauvage ne devrait pas conduire à des effets indésirables car la portion restante devrait être suffisante. Les résultats de l'essai clinique du 2'MOE allèle non spécifique conduit par IONIS (HTTRx), attendus fin 2017, devraient apporter des réponses.



## Conclusion et Perspectives



Ce projet de thèse a permis d'utiliser des outils antisens de nouvelle génération, comme les TcDNA et le système vectorisé U7snRNA, et de les adapter pour une maladie neurodégénérative cruellement en attente de thérapie : la maladie de Huntington.

Ce projet de recherche translationnelle nécessite des connaissances fondamentales sur la fonction de la huntingtine et sur la physiopathologie de la MH, mais aussi sur des mécanismes cellulaires comme l'épissage pour mettre en place des approches thérapeutiques innovantes comme le saut d'exon par exemple. Même si de nombreuses interrogations restent encore en suspens 24 ans après la découverte du gène *HTT* et de la huntingtine, à commencer par la fonction de cette protéine, l'avancée de ces dernières années en termes de stratégies thérapeutiques représente un espoir pour les patients.

Malheureusement, la route entre le laboratoire et la clinique est longue et parsemée d'embûches. Je reste cependant persuadée que les nombreux efforts fournis par la communauté de chercheurs finiront par payer et que cela aboutira à de nombreux traitements, pour la MH mais aussi pour d'autres maladies génétiques.

D'un point de vue plus personnel, cette thèse m'a fait prendre conscience des difficultés inhérentes à la recherche. Par exemple, j'avais seulement accès, au sein du laboratoire et dans le temps imparti, à la méthode du western blot pour évaluer l'efficacité des outils thérapeutiques. J'ai également dû faire face à une variabilité inter-individuelle très importante lors des expériences *in vivo*, qui m'a continuellement fait douter de mes résultats et m'a, encore plus, poussé à augmenter le nombre de souris. Cela n'a d'ailleurs pas toujours été facile, étant donné que nous avons rencontré de nombreux problèmes d'accouplement au sein de l'animalerie. Tous ces « imprévus », fréquents en recherche, ont contribué à ma frustration. C'est aussi pourquoi les biomarqueurs sont indispensables et essentiels pour valider ou non une approche thérapeutique.

J'ai également pris conscience du temps nécessaire à l'aboutissement d'un projet de recherche. Il faut parfois faire face à des modèles animaux qui ne présentent pas de phénotype avant plusieurs mois, comme c'est le cas ici. Malgré ma motivation pour faire avancer les choses, je regrette de ne pas avoir eu le temps d'évaluer les potentiels effets thérapeutiques des molécules antisens sur le comportement des souris YAC128.

Même si je me suis heurtée à la complexité de la huntingtine et à la difficulté que représente la recherche en générale, je reste d'autant plus admirative devant ce que les chercheurs sont capables de créer, en utilisant des mécanismes cellulaires et en les détournant pour devenir les médicaments de demain.



# Bibliographie





- Agbandje-McKenna, M., and Kleinschmidt, J. (2011). AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol. Biol.* *807*, 47–92.
- Aharoni, R., Saada, R., Eilam, R., Hayardeny, L., Sela, M., and Arnon, R. (2012). Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *251*, 14–24.
- Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, G.P., Lin, C.S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., and Altherr, M. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell Mol. Genet.* *20*, 27–38.
- An, M.C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., Melov, S., and Ellerby, L.M. (2012). Genetic Correction of Huntington's Disease Phenotypes in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *11*, 253–263.
- Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genetics* *11*, 115–116.
- Andre, R., Scahill, R.I., Haider, S., and Tabrizi, S.J. (2014). Biomarker development for Huntington's disease. *Drug Discovery Today* *19*, 972–979.
- Apostol, B.L., Simmons, D.A., Zuccato, C., Illes, K., Pallos, J., Casale, M., Conforti, P., Ramos, C., Roarke, M., Kathuria, S., et al. (2008). CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice. *Mol. Cell. Neurosci.* *39*, 8–20.
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martín, M.A., Rubio, J.C., Ablanedo, P., and Cabello, A. (1998). Complex I Defect in muscle from patients with Huntington's disease: Complex I Defect in HD. *Annals of Neurology* *43*, 397–400.
- Atwal, R.S., Xia, J., Pinchev, D., Taylor, J., Eband, R.M., and Truant, R. (2007). Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Human Molecular Genetics* *16*, 2600–2615.
- Atwal, R.S., Desmond, C.R., Caron, N., Maiuri, T., Xia, J., Sipione, S., and Truant, R. (2011). Kinase inhibitors modulate huntingtin cell localization and toxicity. *Nature Chemical Biology* *7*, 453–460.
- Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 16707–16712.
- Auerbach, W., Hurlbert, M.S., Hilditch-Maguire, P., Wadghiri, Y.Z., Wheeler, V.C., Cohen, S.I., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., and Turnbull, D.H. (2001). The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2515–2523.
- Bachoud-Lévi, A.-C., and Perrier, A.L. (2014). Regenerative medicine in Huntington's disease: Current status on fetal grafts and prospects for the use of pluripotent stem cell. *Revue Neurologique* *170*, 749–762.

Bachoud-Lévi, A.-C., Rémy, P., Nguyễn, J.-P., Brugières, P., Lefaucheur, J.-P., Bourdet, C., Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B., et al. (2000a). Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *The Lancet* 356, 1975–1979.

Bachoud-Lévi, A.C., Déglon, N., Nguyen, J.P., Bloch, J., Bourdet, C., Winkel, L., Rémy, P., Goddard, M., Lefaucheur, J.P., Brugières, P., et al. (2000b). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum. Gene Ther.* 11, 1723–1729.

Bachoud-Lévi, A.-C., Gaura, V., Brugières, P., Lefaucheur, J.-P., Boissé, M.-F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M.-J., Bourdet, C., Remy, P., et al. (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *The Lancet Neurology* 5, 303–309.

Bachoud-Lévi, A.-C., Youssov, K., Charles, P., Rodriguez, D., Chemouilli, P., and Diat, A. (2009). [Prise en charge medico-sociale de la maladie de huntington]. Centre de Référence sur la Maladie de Huntington.

Baldo, B., Paganetti, P., Grueninger, S., Marcellin, D., Kaltenbach, L.S., Lo, D.C., Semmelroth, M., Zivanovic, A., Abramowski, D., Smith, D., et al. (2012). TR-FRET-Based Duplex Immunoassay Reveals an Inverse Correlation of Soluble and Aggregated Mutant huntingtin in Huntington's Disease. *Chemistry & Biology* 19, 264–275.

Barnes, G.T., Duyao, M.P., Ambrose, C.M., McNeil, S., Persichetti, F., Srinidhi, J., Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (1994). Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh). *Somatic Cell and Molecular Genetics* 20, 87–97.

Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers* 15005.

Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., et al. (2010). Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nature Biotechnology* 28, 256–263.

Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., et al. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 2, 47–68.

Baxendale, S., Abdulla, S., Elgar, G., Buck, D., Berks, M., Micklem, G., Durbin, R., Bates, G., Brenner, S., and Beck, S. (1995). Comparative sequence analysis of the human and pufferfish Huntington's disease genes. *Nat. Genet.* 10, 67–76.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, J.B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168–171.

Beal, M.F., Matson, W.R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E.A., Ogawa, T., and Bird, E.D. (1992). Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 108, 80–87.

Beaumont, V., Mrzljak, L., Dijkman, U., Freije, R., Heins, M., Rassoulpour, A., Tombaugh, G., Gelman, S., Bradaia, A., Steidl, E., et al. (2016). The novel KMO inhibitor CHDI-340246 leads to a restoration of

electrophysiological alterations in mouse models of Huntington's disease. *Experimental Neurology* 282, 99–118.

Bemelmans, A.-P., Horellou, P., Pradier, L., Brunet, I., Colin, P., and Mallet, J. (1999). Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Protection of Striatal Neurons in an Excitotoxic Rat Model of Huntington's Disease, as Demonstrated by Adenoviral Gene Transfer. *Human Gene Therapy* 10, 2987–2997.

Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552–1555.

Bhattacharyya, K. (2016). The story of George Huntington and his disease. *Annals of Indian Academy of Neurology* 19, 25.

Bilsen, P.H.J. van, Jaspers, L., Lombardi, M.S., Odekerken, J.C.E., Burchardt, E.N., and Kaemmerer, W.F. (2008). Identification and Allele-Specific Silencing of the Mutant Huntingtin Allele in Huntington's Disease Patient-Derived Fibroblasts. *Human Gene Therapy* 19, 710–718.

Bish, L.T., Sleeper, M.M., Forbes, S.C., Wang, B., Reynolds, C., Singletary, G.E., Trafny, D., Morine, K.J., Sanmiguel, J., Cecchini, S., et al. (2012). Long-term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-mediated Exon Skipping. *Molecular Therapy* 20, 580–589.

Björkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., et al. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J. Exp. Med.* 205, 1869–1877.

Blessing, D., and Déglon, N. (2016). Adeno-associated virus and lentivirus vectors: a refined toolkit for the central nervous system. *Current Opinion in Virology* 21, 61–66.

Bloch, J., Bachoud-Lévi, A.C., Déglon, N., Lefaucheur, J.P., Winkel, L., Palfi, S., Nguyen, J.P., Bourdet, C., Remy, P., Brugières, P., et al. (2004). Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease, Using Polymer-Encapsulated Cells Engineered to Secrete Human Ciliary Neurotrophic Factor: Results of a Phase I Study. *Human Gene Therapy* 15, 968–975.

Boudreau, R.L., McBride, J.L., Martins, I., Shen, S., Xing, Y., Carter, B.J., and Davidson, B.L. (2009). Nonallele-specific Silencing of Mutant and Wild-type Huntingtin Demonstrates Therapeutic Efficacy in Huntington's Disease Mice. *Molecular Therapy* 17, 1053–1063.

Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Mourné, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pagès, C., et al. (2016). CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953–970.

Bové, J., Martínez-Vicente, M., and Vila, M. (2011). Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 437–452.

Brouillet, E., Jenkins, B.G., Hyman, B.T., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Srivastava, R., Roy, D.S., Rosen, B.R., and Beal, M.F. (1993). Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60, 356–359.

Brück, W., Pförtner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., Hanisch, U.-K., Regen, T., van Rossum, D., Brakelmann, L., et al. (2012). Reduced astrocytic NF- $\kappa$ B activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol.* 124, 411–424.

- van der Burg, J.M.M., Björkqvist, M., and Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 8, 765–774.
- Busan, S., and Weeks, K.M. (2013). Role of Context in RNA Structure: Flanking Sequences Reconfigure CAG Motif Folding in *Huntingtin* Exon 1 Transcripts. *Biochemistry* 52, 8219–8225.
- Campbell, J.M., Bacon, T.A., and Wickstrom, E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods* 20, 259–267.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 98, 1076–1084.
- Carri, A.D., Onorati, M., Lelos, M.J., Castiglioni, V., Faedo, A., Menon, R., Camnasio, S., Vuono, R., Spaiardi, P., Talpo, F., et al. (2013). Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. *Development* 140, 301–312.
- Carroll, J.B., Warby, S.C., Southwell, A.L., Doty, C.N., Greenlee, S., Skotte, N., Hung, G., Bennett, C.F., Freier, S.M., and Hayden, M.R. (2011). Potent and Selective Antisense Oligonucleotides Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the Huntington Disease Gene / Allele-Specific Silencing of Mutant Huntingtin. *Molecular Therapy* 19, 2178–2185.
- Carroll, J.B., Bates, G.P., Steffan, J., Saft, C., and Tabrizi, S.J. (2015). Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 14, 1135–1142.
- Casaca-Carreira, J., Toonen, L.J.A., Evers, M.M., Jahanshahi, A., van-Roon-Mom, W.M.C., and Temel, Y. (2016). In vivo proof-of-concept of removal of the huntingtin caspase cleavage motif-encoding exon 12 approach in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84, 93–96.
- Casaca-Carreira, J., Temel, Y., Larrakoetxea, I., and Jahanshahi, A. (2017). Distribution and Penetration of Intracerebroventricularly Administered 2'OMePS Oligonucleotide in the Mouse Brain. *Nucleic Acid Therapeutics* 27, 4–10.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., and Sipione, S. (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* 24, 182–188.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 919–930.
- Cearley, C.N., and Wolfe, J.H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13, 528–537.
- Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* 276, 1494–1505.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., et al. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6, 797–801.

- Chen, Y., Carter, R.L., Cho, I.K., and Chan, A.W.S. (2014). Cell-based therapies for Huntington's disease. *Drug Discovery Today* 19, 980–984.
- Choo, Y.S. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human Molecular Genetics* 13, 1407–1420.
- Cisbani, G., Freeman, T.B., Soulet, D., Saint-Pierre, M., Gagnon, D., Parent, M., Hauser, R.A., Barker, R.A., and Cicchetti, F. (2013). Striatal allografts in patients with Huntington's disease: impact of diminished astrocytes and vascularization on graft viability. *Brain* 136, 433–443.
- Connor, B., Sun, Y., von Hieber, D., Tang, S.K., Jones, K.S., and Maucksch, C. (2016). AAV1/2-mediated BDNF gene therapy in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Gene Therapy* 23, 283–295.
- Coskran, T.M., Morton, D., Menniti, F.S., Adamowicz, W.O., Kleiman, R.J., Ryan, A.M., Strick, C.A., Schmidt, C.J., and Stephenson, D.T. (2006). Immunohistochemical Localization of Phosphodiesterase 10A in Multiple Mammalian Species. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54, 1205–1213.
- Crooke, S.T. (2017). Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* 27, 70–77.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537–548.
- Deckel, A.W., Robinson, R.G., Coyle, J.T., and Sanberg, P.R. (1983). Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur. J. Pharmacol.* 93, 287–288.
- DeMarch, Z., Giampà, C., Patassini, S., Bernardi, G., and Fusco, F.R. (2008). Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease* 30, 375–387.
- Deng, P., Torrest, A., Pollock, K., Dahlenburg, H., Annett, G., Nolte, J.A., and Fink, K.D. (2016). Clinical trial perspective for adult and juvenile Huntington's disease using genetically-engineered mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res* 11, 702–705.
- Dey, N.D., Bombard, M.C., Roland, B.P., Davidson, S., Lu, M., Rossignol, J., Sandstrom, M.I., Skeel, R.L., Lescaudron, L., and Dunbar, G.L. (2010). Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington's disease. *Behavioural Brain Research* 214, 193–200.
- Di Pardo, A., Maglione, V., Alpaugh, M., Horkey, M., Atwal, R.S., Sassone, J., Ciammola, A., Steffan, J.S., Fouad, K., Truant, R., et al. (2012). Ganglioside GM1 induces phosphorylation of mutant huntingtin and restores normal motor behavior in Huntington disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 3528–3533.
- Di Pardo, A., Amico, E., Favellato, M., Castrataro, R., Fucile, S., Squitieri, F., and Maglione, V. (2014). FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* 23, 2251–2265.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., and Reeves, S.A. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075–1081.

- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990–1993.
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., et al. (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 17204–17209.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *Journal of Neuroscience* 27, 3571–3583.
- Donsante, A., McEachin, Z., Riley, J., Leung, C.H., Kanz, L., O'Connor, D.M., and Boulis, N.M. (2016). Intracerebroventricular delivery of self-complementary adeno-associated virus serotype 9 to the adult rat brain. *Gene Therapy* 23, 401–407.
- Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of *Hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* 26, 300–306.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves, S., Bonvento, G., Brouillet, E., Luthi-Carter, R., Hantraye, P., et al. (2009). Sustained effects of nonallele-specific *Huntingtin* silencing. *Annals of Neurology* 65, 276–285.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K.J., and Engelhardt, J.F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* 72, 8568–8577.
- van Duijn, E., Kingma, E.M., and van der Mast, R.C. (2007). Psychopathology in Verified Huntington's Disease Gene Carriers. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 19, 441–448.
- Duyao, M., Ambrose, C.M., Myers, R.H., Novelletto, A., Persichetti, F., and Frontali, M. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Genetics* 4, 387–392.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., and Joyner, A.L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog *Hdh*. *Science* 269, 407–410.
- Ehrnhoefer, D.E., Skotte, N.H., Ladha, S., Nguyen, Y.T.N., Qiu, X., Deng, Y., Huynh, K.T., Engemann, S., Nielsen, S.M., Becanovic, K., et al. (2014). p53 increases caspase-6 expression and activation in muscle tissue expressing mutant huntingtin. *Human Molecular Genetics* 23, 717–729.
- El-Daher, M.-T., Hangen, E., Bruyere, J., Poizat, G., Al-Ramahi, I., Pardo, R., Bourg, N., Souquere, S., Mayet, C., Pierron, G., et al. (2015). Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *The EMBO Journal* 34, 2255–2271.
- Engelender, S., Sharp, A.H., Colomer, V., Tokito, M.K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E.L., and Ross, C.A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2205–2212.

- Evers, M.M., Pepers, B.A., van Deutekom, J.C.T., Mulders, S.A.M., den Dunnen, J.T., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G.-J.B., and van Roon-Mom, W.M.C. (2011). Targeting Several CAG Expansion Diseases by a Single Antisense Oligonucleotide. *PLoS ONE* 6, e24308.
- Evers, M.M., Tran, H.-D., Zalachoras, I., Meijer, O.C., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.-J.B., Aartsma-Rus, A., and van Roon-Mom, W.M.C. (2014). Preventing Formation of Toxic N-Terminal Huntingtin Fragments Through Antisense Oligonucleotide-Mediated Protein Modification. *Nucleic Acid Therapeutics* 24, 4–12.
- Evers, M.M., Toonen, L.J.A., and van Roon-Mom, W.M.C. (2015). Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews* 87, 90–103.
- Ezzat, K., Aoki, Y., Koo, T., McClorey, G., Benner, L., Coenen-Stass, A., O'Donovan, L., Lehto, T., Garcia-Guerra, A., Nordin, J., et al. (2015). Self-Assembly into Nanoparticles Is Essential for Receptor Mediated Uptake of Therapeutic Antisense Oligonucleotides. *Nano Letters* 15, 4364–4373.
- Fellmann, C., and Lowe, S.W. (2013). Stable RNA interference rules for silencing. *Nature Cell Biology* 16, 10–18.
- Ferrante, R.J., Kubilus, J.K., Lee, J., Ryu, H., Beesen, A., Zucker, B., Smith, K., Kowall, N.W., Ratan, R.R., Luthi-Carter, R., et al. (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J. Neurosci.* 23, 9418–9427.
- Finkbeiner, S. (2011). Huntington's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a007476–a007476.
- Fiszer, A., Mykowska, A., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats. *Nucleic Acids Research* 39, 5578–5585.
- Fiszer, A., Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Mykowska, A., and Krzyzosiak, W.J. (2013). Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Nucleic Acids Research* 41, 10426–10437.
- François, V., Klein, A.F., Beley, C., Jollet, A., Lemercier, C., Garcia, L., and Furling, D. (2011). Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 85–87.
- Franich, N.R., Fitzsimons, H.L., Fong, D.M., Klugmann, M., During, M.J., and Young, D. (2008). AAV Vector-mediated RNAi of Mutant Huntingtin Expression Is Neuroprotective in a Novel Genetic Rat Model of Huntington's Disease. *Molecular Therapy* 16, 947–956.
- Frieden, M., Hansen, H.F., and Koch, T. (2003). Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNA-DNA chimeras. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22, 1041–1043.
- Furtado, S., Suchowersky, O., Rewcastle, N.B., Graham, L., Klimek, M.L., and Garber, A. (1996). Relationship between trinucleotide repeats and neuropathological changes in Huntington's disease. *Annals of Neurology* 39, 132–136.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 20211–20220.



- Gagnon, K.T., Pendergraff, H.M., Deleavey, G.F., Swayze, E.E., Potier, P., Randolph, J., Roesch, E.B., Chattopadhyaya, J., Damha, M.J., Bennett, C.F., et al. (2010). Allele-Selective Inhibition of Mutant *Huntingtin* Expression with Antisense Oligonucleotides Targeting the Expanded CAG Repeat. *Biochemistry* 49, 10166–10178.
- Gardian, G., Browne, S.E., Choi, D.-K., Klivenyi, P., Gregorio, J., Kubilus, J.K., Ryu, H., Langley, B., Ratan, R.R., Ferrante, R.J., et al. (2005). Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Journal of Biological Chemistry* 280, 556–563.
- Garriga-Canut, M., Agustin-Pavon, C., Herrmann, F., Sanchez, A., Dierssen, M., Fillat, C., and Isalan, M. (2012). Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E3136–E3145.
- Geary, R.S., Watanabe, T.A., Truong, L., Freier, S., Lesnik, E.A., Sioufi, N.B., Sasmor, H., Manoharan, M., and Levin, A.A. (2001). Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 890–897.
- Geary, R.S., Norris, D., Yu, R., and Bennett, C.F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 87, 46–51.
- Geva, M., Kusko, R., Soares, H., Fowler, K.D., Birnberg, T., Barash, S., -Wagner, A.M., Fine, T., Lysaght, A., Weiner, B., et al. (2016). Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington Disease. *Human Molecular Genetics* 25, 3975–3987.
- Giampà, C., Laurenti, D., Anzilotti, S., Bernardi, G., Menniti, F.S., and Fusco, F.R. (2010). Inhibition of the Striatal Specific Phosphodiesterase PDE10A Ameliorates Striatal and Cortical Pathology in R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* 5, e13417.
- Giampà, C., Montagna, E., Dato, C., Melone, M.A.B., Bernardi, G., and Fusco, F.R. (2013). Systemic Delivery of Recombinant Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* 8, e64037.
- Gianfriddo, M., Melani, A., Turchi, D., Giovannini, M.G., and Pedata, F. (2004). Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiology of Disease* 17, 77–88.
- Gil, J.M., and Rego, A.C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* 27, 2803–2820.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., et al. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genetics* 13, 442–449.
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schümperli, D., and Kole, R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4929–4934.
- Gottfried, M., Lavine, L., and Roessmann, U. (1981). Neuropathological findings in Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Acta Neuropathol.* 55, 163–165.
- Goyenvallé, A. (2004). Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306, 1796–1799.

- Goyenvalle, A., Babbs, A., Wright, J., Wilkins, V., Powell, D., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012a). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2559–2571.
- Goyenvalle, A., Wright, J., Babbs, A., Wilkins, V., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012b). Engineering Multiple U7snRNA Constructs to Induce Single and Multiexon-skipping for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* *20*, 1212–1221.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussent, R., Ferry, A., Voit, T., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* *21*, 270–275.
- Goyenvalle, A., Leumann, C., and Garcia, L. (2016). Therapeutic Potential of Tricyclo-DNA antisense oligonucleotides. *J Neuromuscul Dis* *3*, 157–167.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., et al. (2006). Cleavage at the Caspase-6 Site Is Required for Neuronal Dysfunction and Degeneration Due to Mutant Huntingtin. *Cell* *125*, 1179–1191.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.-H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.-H., Sun, Y.E., et al. (2008). Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *Journal of Neuroscience* *28*, 6182–6195.
- Grimm, C., Stefanovic, B., and Schümperli, D. (1993). The low abundance of U7 snRNA is partly determined by its Sm binding site. *EMBO J.* *12*, 1229–1238.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* *39*, 385–389.
- Gu, X., Greiner, E.R., Mishra, R., Kodali, R., Osmand, A., Finkbeiner, S., Steffan, J.S., Thompson, L.M., Wetzel, R., and Yang, X.W. (2009). Serines 13 and 16 Are Critical Determinants of Full-Length Human Mutant Huntingtin Induced Disease Pathogenesis in HD Mice. *Neuron* *64*, 828–840.
- Guidetti, P., Luthicarter, R., Augood, S., and Schwarcz, R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiology of Disease* *17*, 455–461.
- Gunawardena, S., Her, L.-S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., and Goldstein, L.S.B. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* *40*, 25–40.
- Hacein-Bey-Abina, S. (2003). LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* *302*, 415–419.
- Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends in Biochemical Sciences* *28*, 425–433.
- Harper, S.Q., Staber, P.D., He, X., Eliason, S.L., Martins, I.H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R.M., Paulson, H.L., and Davidson, B.L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 5820–5825.

- Heasman, J. (2002). Morpholino Oligos: Making Sense of Antisense? *Developmental Biology* 243, 209–214.
- Hilditch-Maguire, P., Trettel, F., Passani, L.A., Auerbach, A., Persichetti, F., and MacDonald, M.E. (2000). Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2789–2797.
- Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A.S., et al. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2041–2046.
- Hoffner, G., Kahlem, P., and Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with  $\beta$ -tubulin: relevance to Huntington's disease. *Journal of Cell Science* 115, 941–948.
- Holm, I.E., Alstrup, A.K.O., and Luo, Y. (2016). Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders: Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *The Journal of Pathology* 238, 267–287.
- Holmberg, C.I., Staniszewski, K.E., Mensah, K.N., Matouschek, A., and Morimoto, R.I. (2004). Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J.* 23, 4307–4318.
- Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K.E., Roos, R.A., van Ommen, G.-J.B., and Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Human Molecular Genetics* 2, 2069–2073.
- von Horsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H.P., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., Bader, M., Pabst, R., Kobbe, P., Krotova, J., et al. (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 12, 617–624.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262–1278.
- Hu, J., and Corey, D.R. (2007). Inhibiting Gene Expression with Peptide Nucleic Acid (PNA)-Peptide Conjugates That Target Chromosomal DNA<sup>†</sup>. *Biochemistry* 46, 7581–7589.
- Hu, J., Matsui, M., and Corey, D.R. (2009b). Allele-Selective Inhibition of Mutant Huntingtin by Peptide Nucleic Acid-Peptide Conjugates, Locked Nucleic Acid, and Small Interfering RNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1175, 24–31.
- Hu, J., Matsui, M., Gagnon, K.T., Schwartz, J.C., Gabillet, S., Arar, K., Wu, J., Bezprozvanny, I., and Corey, D.R. (2009a). Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nature Biotechnology* 27, 478–484.
- Hu, J., Liu, J., and Corey, D.R. (2010). Allele-Selective Inhibition of Huntingtin Expression by Switching to an miRNA-like RNAi Mechanism. *Chemistry & Biology* 17, 1183–1188.
- Hu, J., Gagnon, K.T., Liu, J., Watts, J.K., Syeda-Nawaz, J., Bennett, C.F., Swayze, E.E., Randolph, J., Chattopadhyaya, J., and Corey, D.R. (2011). Allele-selective inhibition of ataxin-3 (ATX3) expression by antisense oligomers and duplex RNAs. *Biological Chemistry* 392.

Hughes, A.C., Mort, M., Elliston, L., Thomas, R.M., Brooks, S.P., Dunnett, S.B., and Jones, L. (2014). Identification of Novel Alternative Splicing Events in the Huntingtin Gene and Assessment of the Functional Consequences Using Structural Protein Homology Modelling. *Journal of Molecular Biology* 426, 1428–1438.

Huntington, G. (2003). On chorea. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 15, 109–112.

Huntington Study Group (2006). Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: A randomized controlled trial. *Neurology* 66, 366–372.

Huntington Study Group DOMINO Investigators (2010). A futility study of minocycline in Huntington's disease. *Mov. Disord.* 25, 2219–2224.

Huntington Study Group Pre2CARE Investigators (2010). Safety and tolerability of high-dosage coenzyme Q10 in Huntington's disease and healthy subjects. *Movement Disorders* 25, 1924–1928.

Huntington Study Group Reach2HD Investigators (2015). Safety, tolerability, and efficacy of PBT2 in Huntington's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 14, 39–47.

Imbert, M., Dias-Florencio, G., and Goyenvalle, A. (2017). Viral Vector-Mediated Antisense Therapy for Genetic Diseases. *Genes* 8, 51.

Jacobsen, J.C., Bawden, C.S., Rudiger, S.R., McLaughlan, C.J., Reid, S.J., Waldvogel, H.J., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, S.K., Kelly, J.M., et al. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics* 19, 1873–1882.

Jeon, I., Lee, N., Li, J.-Y., Park, I.-H., Park, K.S., Moon, J., Shim, S.H., Choi, C., Chang, D.-J., Kwon, J., et al. (2012). Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 2054–2062.

Jeon, J., Kim, W., Jang, J., Isacson, O., and Seo, H. (2016). Gene therapy by proteasome activator, PA28 $\gamma$ , improves motor coordination and proteasome function in Huntington's disease YAC128 mice. *Neuroscience* 324, 20–28.

Jia, H., Kast, R.J., Steffan, J.S., and Thomas, E.A. (2012). Selective histone deacetylase (HDAC) inhibition imparts beneficial effects in Huntington's disease mice: implications for the ubiquitin-proteasomal and autophagy systems. *Human Molecular Genetics* 21, 5280–5293.

Jiang, M., Peng, Q., Liu, X., Jin, J., Hou, Z., Zhang, J., Mori, S., Ross, C.A., Ye, K., and Duan, W. (2013). Small-molecule TrkB receptor agonists improve motor function and extend survival in a mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 22, 2462–2470.

Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 1088–1095.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in Cell Biology* 22, 407–417.

Kay, C., Fisher, E.R., and Hayden, M.R. (2014a). Epidemiology. In *Huntington's Disease*, (eds Bates, Tabrizi and Jones), p. Ch. 7.

- Kay, C., Skotte, N.H., Southwell, A.L., and Hayden, M.R. (2014b). Personalized gene silencing therapeutics for Huntington disease: Personalized HD gene silencing. *Clinical Genetics* 86, 29–36.
- Kay, C., Collins, J.A., Skotte, N.H., Southwell, A.L., Warby, S.C., Caron, N.S., Doty, C.N., Nguyen, B., Griguoli, A., Ross, C.J., et al. (2015). Huntingtin Haplotypes Provide Prioritized Target Panels for Allele-specific Silencing in Huntington Disease Patients of European Ancestry. *Molecular Therapy* 23, 1759–1771.
- Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.-H., Chen, J.D., et al. (2002). Huntingtin Is Present in the Nucleus, Interacts with the Transcriptional Corepressor C-terminal Binding Protein, and Represses Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277, 7466–7476.
- Kells, A.P., Fong, D.M., Dragunow, M., During, M.J., Young, D., and Connor, B. (2004). AAV-Mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of huntington disease. *Molecular Therapy* 9, 682–688.
- Kells, A.P., Henry, R.A., and Connor, B. (2008). AAV–BDNF mediated attenuation of quinolinic acid-induced neuropathology and motor function impairment. *Gene Therapy* 15, 966–977.
- Kendall, A.L., Rayment, F.D., Torres, E.M., Baker, H.F., Ridley, R.M., and Dunnett, S.B. (1998). Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington’s disease. *Nature Medicine* 4, 727–729.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.-H., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington’s disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 12784–12789.
- Klein, A., Lane, E.L., and Dunnett, S.B. (2013). Brain repair in a unilateral rat model of Huntington’s disease: new insights into impairment and restoration of forelimb movement patterns. *Cell Transplant* 22, 1735–1751.
- Kolli, N., Lu, M., Maiti, P., Rossignol, J., and Dunbar, G. (2017). CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington’s Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 754.
- Kordasiewicz, H.B., Stanek, L.M., Wancewicz, E.V., Mazur, C., McAlonis, M.M., Pytel, K.A., Artates, J.W., Weiss, A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., et al. (2012). Sustained Therapeutic Reversal of Huntington’s Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* 74, 1031–1044.
- Kuemmerle, S., Gutekunst, C.A., Klein, A.M., Li, X.J., Li, S.H., Beal, M.F., Hersch, S.M., and Ferrante, R.J. (1999). Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington’s disease. *Ann. Neurol.* 46, 842–849.
- Labbadia, J., Novoselov, S.S., Bett, J.S., Weiss, A., Paganetti, P., Bates, G.P., and Cheetham, M.E. (2012). Suppression of protein aggregation by chaperone modification of high molecular weight complexes. *Brain* 135, 1180–1196.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a009621–a009621.

- Landles, C., Sathasivam, K., Weiss, A., Woodman, B., Moffitt, H., Finkbeiner, S., Sun, B., Gafni, J., Ellerby, L.M., Trottier, Y., et al. (2010). Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J. Biol. Chem.* *285*, 8808–8823.
- Landles, C., Weiss, A., Franklin, S., Howland, D., and Bates, G. (2012). Caspase-6 does not contribute to the proteolysis of mutant huntingtin in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS Currents* *4*, e4fd085bfc9973.
- Landwehrmeyer, G.B., Dubois, B., de Yébenes, J.G., Kremer, B., Gaus, W., Kraus, P.H., Przuntek, H., Dib, M., Doble, A., Fischer, W., et al. (2007). Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Annals of Neurology* *62*, 262–272.
- Lawrence, A.D., Sahakian, B.J., Hodges, J.R., Rosser, A.E., Lange, K.W., and Robbins, T.W. (1996). Executive and mnemonic functions in early Huntington's disease. *Brain* *119*, 1633–1646.
- Le Gal La Salle, G., Robert, J.J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L.D., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* *259*, 988–990.
- Leavitt, B.R., Guttman, J.A., Hodgson, J.G., Kimel, G.H., Singaraja, R., Vogl, A.W., and Hayden, M.R. (2001). Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 313–324.
- Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R.K., Wellington, C.L., Raymond, L.A., and Hayden, M.R. (2006). Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J. Neurochem.* *96*, 1121–1129.
- Lee, J.H., Tecedor, L., Chen, Y.H., Monteys, A.M., Sowada, M.J., Thompson, L.M., and Davidson, B.L. (2015). Reinstating Aberrant mTORC1 Activity in Huntington's Disease Mice Improves Disease Phenotypes. *Neuron* *85*, 303–315.
- Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Im, W.-S., Park, J.-E., Lim, H.-C., Won, C.-H., Shin, S.-H., Lee, S.K., Kim, M., et al. (2009). Slowed progression in models of huntington disease by adipose stem cell transplantation. *Annals of Neurology* *66*, 671–681.
- Li, S.H., Schilling, G., Young, W.S., Li, X.J., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V., Abbott, M.H., Franz, M.L., and Ranen, N.G. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* *11*, 985–993.
- Li, W., Serpell, L.C., Carter, W.J., Rubinsztein, D.C., and Huntington, J.A. (2006). Expression and Characterization of Full-length Human Huntingtin, an Elongated HEAT Repeat Protein. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 15916–15922.
- Lin, B., Rommens, J.M., Graham, R.K., Kalchman, M., MacDonald, H., Nasir, J., Delaney, A., Goldberg, Y.P., and Hayden, M.R. (1993). Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. *Human Molecular Genetics* *2*, 1541–1545.
- Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., and Detloff, P.J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 137–144.

Lione, L.A., Carter, R.J., Hunt, M.J., Bates, G.P., Morton, A.J., and Dunnett, S.B. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.* *19*, 10428–10437.

Liu, S., Asparuhova, M., Brondani, V., Ziekau, I., Klimkait, T., and Schümperli, D. (2004). Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res.* *32*, 3752–3759.

Liu, W., Goto, J., Wang, Y.-L., Murata, M., Wada, K., and Kanazawa, I. (2003). Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* *79B*, 293–298.

Lombardi, M.S., Jaspers, L., Spronkmans, C., Gellera, C., Taroni, F., Di Maria, E., Donato, S.D., and Kaemmerer, W.F. (2009). A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference. *Experimental Neurology* *217*, 312–319.

Lu, X.-H., and Yang, X.W. (2012). "Huntingtin Holiday": Progress toward an Antisense Therapy for Huntington's Disease. *Neuron* *74*, 964–966.

Lubini, P., Zürcher, W., and Egli, M. (1994). Stabilizing effects of the RNA 2'-substituent: crystal structure of an oligodeoxynucleotide duplex containing 2'-O-methylated adenosines. *Chem. Biol.* *1*, 39–45.

Lundin, K.E., Gissberg, O., and Smith, C.I.E. (2015). Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Human Gene Therapy* *26*, 475–485.

Ma, L., Hu, B., Liu, Y., Vermilyea, S.C., Liu, H., Gao, L., Sun, Y., Zhang, X., and Zhang, S.-C. (2012). Human Embryonic Stem Cell-Derived GABA Neurons Correct Locomotion Deficits in Quinolinic Acid-Lesioned Mice. *Cell Stem Cell* *10*, 455–464.

MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* *72*, 971–983.

Maiuri, T., Woloshansky, T., Xia, J., and Truant, R. (2013). The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and ciliary export signal. *Human Molecular Genetics* *22*, 1383–1394.

Malkki, H. (2016). Huntington disease: Selective deactivation of Huntington disease mutant allele by CRISPR–Cas9 gene editing. *Nature Reviews Neurology* *12*, 614–615.

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W., et al. (1996). Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell* *87*, 493–506.

Marchina, E., Misasi, S., Bozzato, A., Ferraboli, S., Agosti, C., Rozzini, L., Borsani, G., Barlati, S., and Padovani, A. (2014). Gene expression profile in fibroblasts of Huntington's disease patients and controls. *Journal of the Neurological Sciences* *337*, 42–46.

Margaret M. Esiri, and James H. Morris (1997). *The neuropathology of dementia*. Cambridge University Press.

- McBride, J.L., Ramaswamy, S., Gasmi, M., Bartus, R.T., Herzog, C.D., Brandon, E.P., Zhou, L., Pitzer, M.R., Berry-Kravis, E.M., and Kordower, J.H. (2006). Viral delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves behavior and protects striatal neurons in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9345–9350.
- McBride, J.L., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Monteys, A.M., Martins, I., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., et al. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5868–5873.
- McGarry, A., McDermott, M., Kieburz, K., de Blic, E.A., Beal, F., Marder, K., Ross, C., Shoulson, I., Gilbert, P., Mallonee, W.M., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *Neurology* 88, 152–159.
- McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263, 517–519.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated Protein-1 with Kinesin Light Chain: IMPLICATIONS IN INTRACELLULAR TRAFFICKING IN NEURONS. *Journal of Biological Chemistry* 281, 3552–3559.
- McNeil, S.M., Novelletto, A., Srinidhi, J., Barnes, G., Kornbluth, I., Altherr, M.R., Wasmuth, J.J., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., and Myers, R.H. (1997). Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Human Molecular Genetics* 6, 775–779.
- Menalled, L., El-Khodori, B.F., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S.J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X.W., MacDonald, M., et al. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of Disease* 35, 319–336.
- Menalled, L., Lutz, C., Ramboz, S., Brunner, D., Lager, B., Noble, S., Park, L., and Howland, D. (2014). A field guide to working with mouse models of Huntington's disease.
- Menalled, L.B., Kudwa, A.E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., et al. (2012). Comprehensive Behavioral and Molecular Characterization of a New Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease: zQ175. *PLoS ONE* 7, e49838.
- Merienne, N., and Déglon, N. (2015). Approches de *gene silencing* pour le traitement de la maladie de Huntington. *Médecine/Sciences* 31, 159–167.
- Metzler, M., Chen, N., Helgason, C.D., Graham, R.K., Nichol, K., McCutcheon, K., Nasir, J., Humphries, R.K., Raymond, L.A., and Hayden, M.R. (1999). Life without huntingtin: normal differentiation into functional neurons. *J. Neurochem.* 72, 1009–1018.
- Metzler, M., Helgason, C.D., Dragatsis, I., Zhang, T., Gan, L., Pineault, N., Zeitlin, S.O., Humphries, R.K., and Hayden, M.R. (2000). Huntingtin is required for normal hematopoiesis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 387–394.
- Millecamps, S., and Julien, J.-P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 161–176.



- Miller, B.R., Dorner, J.L., Shou, M., Sari, Y., Barton, S.J., Sengelaub, D.R., Kennedy, R.T., and Rebec, G.V. (2008). Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse. *Neuroscience* 153, 329–337.
- Milunsky, J.M., Maher, T.A., Loose, B.A., Darras, B.T., and Ito, M. (2003). XL PCR for the detection of large trinucleotide expansions in juvenile Huntington's disease. *Clinical Genetics* 64, 70–73.
- Mittoux, V., Joseph, J.-M., Conde, F., Palfi, S., Dautry, C., Poyot, T., Bloch, J., Deglon, N., Ouary, S., Nimchinsky, E.A., et al. (2000). Restoration of Cognitive and Motor Functions by Ciliary Neurotrophic Factor in a Primate Model of Huntington's Disease. *Human Gene Therapy* 11, 1177–1188.
- Mittoux, V., Ouary, S., Monville, C., Lisovoski, F., Poyot, T., Conde, F., Escartin, C., Robichon, R., Brouillet, E., Peschanski, M., et al. (2002). Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J. Neurosci.* 22, 4478–4486.
- Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinasso, C.J., Kawasaki, A.M., Cook, P.D., and Freier, S.M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* 268, 14514–14522.
- Monteys, A.M., Ebanks, S.A., Keiser, M.S., and Davidson, B.L. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy* 25, 12–23.
- Moraes, L., Vasconcelos-dos-Santos, A., Santana, F.C., Godoy, M.A., Rosado-de-Castro, P.H., Jasmin, Azevedo-Pereira, R.L., Cintra, W.M., Gasparetto, E.L., Santiago, M.F., et al. (2012). Neuroprotective effects and magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells labeled with SPION in a rat model of Huntington's disease. *Stem Cell Research* 9, 143–155.
- Morfini, G.A., You, Y.-M., Pollema, S.L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., Björkblom, B., Coffey, E.T., Bagnato, C., Han, D., et al. (2009). Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nature Neuroscience* 12, 864–871.
- Mort, M., Carlisle, F.A., Waite, A.J., Elliston, L., Allen, N.D., Jones, L., and Hughes, A.C. (2015). Huntingtin Exists as Multiple Splice Forms in Human Brain. *Journal of Huntington's Disease* 4, 161–171.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U. (2000). Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7841–7846.
- Murlidharan, G., Samulski, R.J., and Asokan, A. (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7.
- Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C.A., Mark, R.J., and Gusella, J.F. (1989). Homozygote for Huntington disease. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 615–618.
- Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 457–463.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.

Nicolas, G., Devys, D., Goldenberg, A., Maltête, D., Hervé, C., Hannequin, D., and Guyant-Maréchal, L. (2011). Juvenile Huntington disease in an 18-month-old boy revealed by global developmental delay and reduced cerebellar volume. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155, 815–818.

Nicoleau, C., Viegas, P., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2011). Human Pluripotent Stem Cell Therapy for Huntington's Disease: Technical, Immunological, and Safety Challenges. *Neurotherapeutics* 8, 562–576.

Nopoulos, P.C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 18, 91.

Novak, M.J.U., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's Disease: Clinical Presentation and Treatment. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 297–323.

Oliveira, J.M.A., Chen, S., Almeida, S., Riley, R., Goncalves, J., Oliveira, C.R., Hayden, M.R., Nicholls, D.G., Ellerby, L.M., and Rego, A.C. (2006). Mitochondrial-Dependent Ca<sup>2+</sup> Handling in Huntington's Disease Striatal Cells: Effect of Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Neuroscience* 26, 11174–11186.

Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., et al. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91, 753–763.

Østergaard, M.E., Southwell, A.L., Kordasiewicz, H., Watt, A.T., Skotte, N.H., Doty, C.N., Vaid, K., Villanueva, E.B., Swayze, E.E., Frank Bennett, C., et al. (2013). Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS. *Nucleic Acids Research* 41, 9634–9650.

Paine, H. (2015). Does loss of the normal protein function contribute to the pathogenesis of Huntington's disease? *Bioscience Horizons* 8, hzv005.

Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*.

Peng Ho, S., Livanov, V., Zhang, W., Li, J., and Lesher, T. (1998). Modification of phosphorothioate oligonucleotides yields potent analogs with minimal toxicity for antisense experiments in the CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62, 1–11.

Perrin, V., Régulier, E., Abbas-Terki, T., Hassig, R., Brouillet, E., Aebischer, P., Luthi-Carter, R., and Déglon, N. (2007). Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in Lentiviral-based Rat Models of Huntington's Disease. *Molecular Therapy* 15, 903–911.

Pittenger, M.F. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143–147.

Polidori, M.C., Mecocci, P., Browne, S.E., Senin, U., and Beal, M.F. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci. Lett.* 272, 53–56.

Pollock, K., Dahlenburg, H., Nelson, H., Fink, K.D., Cary, W., Hendrix, K., Annett, G., Torrest, A., Deng, P., Gutierrez, J., et al. (2016). Human Mesenchymal Stem Cells Genetically Engineered to Overexpress

Brain-derived Neurotrophic Factor Improve Outcomes in Huntington's Disease Mouse Models. *Molecular Therapy* 24, 965–977.

Potter, B.V., Romaniuk, P.J., and Eckstein, F. (1983). Stereochemical course of DNA hydrolysis by nuclease S1. *J. Biol. Chem.* 258, 1758–1760.

Pouladi, M.A., Graham, R.K., Karasinska, J.M., Xie, Y., Santos, R.D., Petersen, A., and Hayden, M.R. (2008). Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin. *Brain* 132, 919–932.

Pouladi, M.A., Stanek, L.M., Xie, Y., Franciosi, S., Southwell, A.L., Deng, Y., Butland, S., Zhang, W., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., et al. (2012). Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. *Human Molecular Genetics* 21, 2219–2232.

Pouladi, M.A., Morton, A.J., and Hayden, M.R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 708–721.

Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., and Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders* 27, 1083–1091.

Ramaswamy, S., McBride, J.L., and Kordower, J.H. (2007). Animal models of Huntington's disease. *Ilar Journal* 48, 356–373.

Ranen, N.G., Stine, O.C., Abbott, M.H., Sherr, M., Codori, A.-M., Franz, M.L., Chao, N.I., Chung, A.S., Pleasant, N., Callahan, C., et al. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG) n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *American Journal of Human Genetics* 57, 593.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics* 36, 585–595.

Relizani, K., Griffith, G., Echevarría, L., Zarrouki, F., Facchinetti, P., Vaillend, C., Leumann, C., Garcia, L., and Goyenvalle, A. (2017). Efficacy and Safety Profile of Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy Mouse Model. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 8, 144–157.

Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2010). Chemical Inducers of Autophagy That Enhance the Clearance of Mutant Proteins in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Biological Chemistry* 285, 11061–11067.

Renneberg, D., and Leumann, C.J. (2002). Watson-Crick base-pairing properties of tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5993–6002.

Renneberg, D., Bouliong, E., Reber, U., Schümperli, D., and Leumann, C.J. (2002). Antisense properties of tricyclo-DNA. *Nucleic Acids Res.* 30, 2751–2757.

Rifai, A., Brysch, W., Fadden, K., Clark, J., and Schlingensiepen, K.H. (1996). Clearance kinetics, biodistribution, and organ saturability of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in mice. *Am. J. Pathol.* 149, 717–725.

Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M.R., Li, Y., et al. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *Journal of Neuroscience* 20, 3705–3713.

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., and Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of Procaspase-9 Processing. *Journal of Biological Chemistry* 276, 14545–14548.

Robin, V., Griffith, G., Carter, J.-P.L., Leumann, C.J., Garcia, L., and Goyenvallé, A. (2017). Efficient SMN Rescue following Subcutaneous Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotide Treatment. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 7, 81–89.

Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V.N., Kazantsev, A., Marsh, J.L., Sullivan, P.G., Steffan, J.S., Sensi, S.L., and Thompson, L.M. (2006). The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Human Molecular Genetics* 16, 61–77.

Rodriguez-Lebron, E., Denovan-Wright, E.M., Nash, K., Lewin, A.S., and Mandel, R.J. (2005). Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Molecular Therapy* 12, 618–633.

Rosas, H.D., Doros, G., Gevorkian, S., Malarick, K., Reuter, M., Coutu, J.-P., Triggs, T.D., Wilkens, P.J., Matson, W., Salat, D.H., et al. (2014). PRECREST: A phase II prevention and biomarker trial of creatine in at-risk Huntington disease. *Neurology* 82, 850–857.

Rüb, U., Seidel, K., Heinsen, H., Vonsattel, J.P., den Dunnen, W.F., and Korf, H.W. (2016). Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain: The brain in Huntington's disease. *Brain Pathology* 26, 726–740.

Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.-J., Chotai, K., Connarty, M., Craufurd, D., Curtis, A., et al. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30–40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36–39 repeats. *American Journal of Human Genetics* 59, 16.

Ruiz, M., and Déglon, N. (2012). Viral-mediated overexpression of mutant huntingtin to model HD in various species. *Neurobiology of Disease* 48, 202–211.

Rutter, A.R., Poffe, A., Cavallini, P., Davis, T.G., Schneck, J., Negri, M., Vicentini, E., Montanari, D., Arban, R., Gray, F.A., et al. (2014). GSK356278, a Potent, Selective, Brain-Penetrant Phosphodiesterase 4 Inhibitor That Demonstrates Anxiolytic and Cognition-Enhancing Effects without Inducing Side Effects in Preclinical Species. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 350, 153–163.

Ruzo, A., Ismailoglu, I., Popowski, M., Haremaki, T., Croft, G.F., Deglincerti, A., and Brivanlou, A.H. (2015). Discovery of Novel Isoforms of Huntingtin Reveals a New Hominid-Specific Exon. *PLOS ONE* 10, e0127687.

Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P.G., Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 161–172.

Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926.

- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions. *Cell* 95, 55–66.
- Schilling, G. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1999 May;8(5):943]. *Human Molecular Genetics* 8, 397–407.
- Schwarz, D.S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J.T., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P.S., Aronin, N., Xu, Z., and Zamore, P.D. (2006). Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet.* 2, e140.
- Sellal, F. (1996). [Subcortical dementia]. *Rev Med Interne* 17, 419–424.
- Serguera, C., and Bemelmans, A.-P. (2014). Gene therapy of the central nervous system: General considerations on viral vectors for gene transfer into the brain. *Revue Neurologique* 170, 727–738.
- Shannon, K.M., and Frait, A. (2015). Therapeutic advances in Huntington’s Disease: Therapeutic Advances in HD. *Movement Disorders* 30, 1539–1546.
- Shao, J., and Diamond, M.I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human Molecular Genetics* 16, R115–R123.
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzuk, J.A., Steiner, J.P., and Lo, A. (1995). Widespread expression of Huntington’s disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065–1074.
- Shin, J.W., Kim, K.-H., Chao, M.J., Atwal, R.S., Gillis, T., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., and Lee, J.-M. (2016). Permanent inactivation of Huntington’s disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics* ddw286.
- Simmons, D.A., Belichenko, N.P., Yang, T., Condon, C., Monbureau, M., Shamloo, M., Jing, D., Massa, S.M., and Longo, F.M. (2013). A Small Molecule TrkB Ligand Reduces Motor Impairment and Neuropathology in R6/2 and BACHD Mouse Models of Huntington’s Disease. *Journal of Neuroscience* 33, 18712–18727.
- Singh-Bains, M.K., Waldvogel, H.J., and Faull, R.L.M. (2016). The role of the human globus pallidus in Huntington’s disease: Globus pallidus in HD. *Brain Pathology* 26, 741–751.
- Skotte, N.H., Southwell, A.L., Østergaard, M.E., Carroll, J.B., Warby, S.C., Doty, C.N., Petoukhov, E., Vaid, K., Kordasiewicz, H., Watt, A.T., et al. (2014). Allele-Specific Suppression of Mutant Huntingtin Using Antisense Oligonucleotides: Providing a Therapeutic Option for All Huntington Disease Patients. *PLoS ONE* 9, e107434.
- Slow, E.J. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* 12, 1555–1567.
- Smith, E.S., Jonason, A., Reilly, C., Veeraraghavan, J., Fisher, T., Doherty, M., Klimatcheva, E., Mallow, C., Cornelius, C., Leonard, J.E., et al. (2015). SEMA4D compromises blood–brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease* 73, 254–268.

- Sontag, E.M., Joachimiak, L.A., Tan, Z., Tomlinson, A., Housman, D.E., Glabe, C.G., Potkin, S.G., Frydman, J., and Thompson, L.M. (2013). Exogenous delivery of chaperonin subunit fragment ApiCCT1 modulates mutant Huntingtin cellular phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 3077–3082.
- Southwell, A.L., Warby, S.C., Carroll, J.B., Doty, C.N., Skotte, N.H., Zhang, W., Villanueva, E.B., Kovalik, V., Xie, Y., Pouladi, M.A., et al. (2013). A fully humanized transgenic mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* 22, 18–34.
- Southwell, A.L., Skotte, N.H., Kordasiewicz, H.B., Østergaard, M.E., Watt, A.T., Carroll, J.B., Doty, C.N., Villanueva, E.B., Petoukhov, E., Vaid, K., et al. (2014). In Vivo Evaluation of Candidate Allele-specific Mutant Huntingtin Gene Silencing Antisense Oligonucleotides. *Molecular Therapy* 22, 2093–2106.
- Southwell, A.L., Franciosi, S., Villanueva, E.B., Xie, Y., Winter, L.A., Veeraraghavan, J., Jonason, A., Felczak, B., Zhang, W., Kovalik, V., et al. (2015). Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease* 76, 46–56.
- Southwell, A.L., Skotte, N.H., Villanueva, E.B., Østergaard, M.E., Gu, X., Kordasiewicz, H.B., Kay, C., Cheung, D., Xie, Y., Watl, S., et al. (2017). A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Human Molecular Genetics* ddx021.
- Sprengelmeyer, R., Young, A.W., Calder, A.J., Karnat, A., Lange, H., Hömberg, V., Perrett, D.I., and Rowland, D. (1996). Loss of disgust. *Brain* 119, 1647–1665.
- Steffan, J.S. (2004). SUMO Modification of Huntingtin and Huntington’s Disease Pathology. *Science* 304, 100–104.
- Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.-Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington’s disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6763–6768.
- Steffens, R., and Leumann, C.J. (1997). Tricyclo-DNA: A Phosphodiester-Backbone Based DNA Analog Exhibiting Strong Complementary Base-Pairing Properties. *Journal of the American Chemical Society* 119, 11548–11549.
- Stein, C.A., and Castanotto, D. (2017). FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Molecular Therapy* 25, 1069–1075.
- Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 285–288.
- Stine, O.C., Pleasant, N., Franz, M.L., Abbott, M.H., Folstein, S.E., and Ross, C.A. (1993). Correlation between the onset age of Huntington’s disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Human Molecular Genetics* 2, 1547–1549.
- Sun, X., Marque, L.O., Corder, Z., Pruitt, J.L., Bhat, M., Li, P.P., Kannan, G., Ladenheim, E.E., Moran, T.H., Margolis, R.L., et al. (2014). Phosphorodiamidate morpholino oligomers suppress mutant huntingtin expression and attenuate neurotoxicity. *Human Molecular Genetics* 23, 6302–6317.

- Süssmuth, S.D., Haider, S., Landwehrmeyer, G.B., Farmer, R., Frost, C., Tripepi, G., Andersen, C.A., Di Bacco, M., Lamanna, C., Diodato, E., et al. (2015). An exploratory double-blind, randomized clinical trial with selisistat, a SirT1 inhibitor, in patients with Huntington's disease: An exploratory pharmacodynamic study with selisistat in HD. *British Journal of Clinical Pharmacology* 79, 465–476.
- Suter, D., Tomasini, R., Reber, U., Gorman, L., Kole, R., and Schümperli, D. (1999). Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2415–2423.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takano, H., and Gusella, J.F. (2002). The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neuroscience* 3, 15.
- Taylor, D.M., Moser, R., Régulier, E., Breuillaud, L., Dixon, M., Beesen, A.A., Elliston, L., Silva Santos, M. de F., Kim, J., Jones, L., et al. (2013). MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1) is neuroprotective in Huntington's disease via additive effects of JNK and p38 inhibition. *J. Neurosci.* 33, 2313–2325.
- Telenius, H., Kremer, H.P.H., Thellmann, J., Andrew, S.E., Almqvist, E., Anvret, M., Greenberg, C., Greenberg, J., Lucotte, G., Squitieri, F., et al. (1993). Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG) n repeat length is the sex of the affected parent. *Human Molecular Genetics* 2, 1535–1540.
- The Huntington Study Group HART Investigators (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pridopidine in Huntington's disease: Randomized Trial of Pridopidine in HD. *Movement Disorders* 28, 1407–1415.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *The Journal of Cell Biology* 187, 1083–1099.
- Todd, D., Gowers, I., Dowler, S.J., Wall, M.D., McAllister, G., Fischer, D.F., Dijkstra, S., Fratantoni, S.A., van de Bospoort, R., Veenman-Koepke, J., et al. (2014). A Monoclonal Antibody TrkB Receptor Agonist as a Potential Therapeutic for Huntington's Disease. *PLoS ONE* 9, e87923.
- Träger, U., Andre, R., Lahiri, N., Magnusson-Lind, A., Weiss, A., Grueninger, S., McKinnon, C., Sirinathsinghji, E., Kahlon, S., Pfister, E.L., et al. (2014). HTT-lowering reverses Huntington's disease immune dysfunction caused by NF $\kappa$ B pathway dysregulation. *Brain* 137, 819–833.
- Trottier, Y., Biancalana, V., and Mandel, J.-L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *Journal of Medical Genetics* 31, 377–382.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.-L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature Genetics* 10, 104–110.

- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., et al. (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8195–8209.
- Van Raamsdonk, J.M. (2005). Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* *14*, 1379–1392.
- Vázquez-Manrique, R.P., Farina, F., Cambon, K., Dolores Sequedo, M., Parker, A.J., Millán, J.M., Weiss, A., Déglon, N., and Neri, C. (2016). AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode, cellular and mouse models of Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics* *25*, 1043–1058.
- Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., and Toldi, J. (2012). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature Reviews Drug Discovery* *12*, 64–82.
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp. Neurol.* *152*, 34–40.
- Verny, C., Bachoud-Lévi, A.-C., Durr, A., Goizet, C., Azulay, J.-P., Simonin, C., Tranchant, C., Calvas, F., Krystkowiak, P., Charles, P., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating cysteamine in Huntington’s disease: Trial Evaluating Cysteamine in HD. *Movement Disorders*.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985). Neuropathological classification of Huntington’s disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 559–577.
- Vonsattel, J.P., Keller, C., and Cortes Ramirez, E.P. (2012). Huntington’s disease-neuropathology. *Handbook of Clinical Neurology* *100*, 83–100.
- Vulin, A., Barthélémy, I., Goyenvalle, A., Thibaud, J.-L., Beley, C., Griffith, G., Benchaouir, R., le Hir, M., Unterfinger, Y., Lorain, S., et al. (2012). Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping. *Molecular Therapy* *20*, 2120–2133.
- Wang, G., Liu, X., Gaertig, M.A., Li, S., and Li, X.-J. (2016). Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 3359–3364.
- Wang, X., Zhu, S., Drozda, M., Zhang, W., Stavrovskaya, I.G., Cattaneo, E., Ferrante, R.J., Kristal, B.S., and Friedlander, R.M. (2003). Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10483–10487.
- Wang, Y.-L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K., and Kanazawa, I. (2005). Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington’s disease by siRNA. *Neuroscience Research* *53*, 241–249.
- Weiss, A., Abramowski, D., Bibel, M., Bodner, R., Chopra, V., DiFiglia, M., Fox, J., Kegel, K., Klein, C., Grueninger, S., et al. (2009). Single-step detection of mutant huntingtin in animal and human tissues: A bioassay for Huntington’s disease. *Analytical Biochemistry* *395*, 8–15.
- Wellington, C.L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., et al. (2000). Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 19831–19838.



Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., and Ramos Arroyo, M.A. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326, 194–197.

Wheeler, V. (1999). Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Human Molecular Genetics* 8, 115–122.

Wheeler, T.M., Sobczak, K., Lueck, J.D., Osborne, R.J., Lin, X., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2009). Reversal of RNA Dominance by Displacement of Protein Sequestered on Triplet Repeat RNA. *Science* 325, 336–339.

Wild, E.J., and Tabrizi, S.J. (2014). Targets for future clinical trials in Huntington's disease: What's in the pipeline?: Future Clinical Trials in HD. *Movement Disorders* 29, 1434–1445.

Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1393–1403.

Xie, Y., Hayden, M.R., and Xu, B. (2010). BDNF Overexpression in the Forebrain Rescues Huntington's Disease Phenotypes in YAC128 Mice. *Journal of Neuroscience* 30, 14708–14718.

Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H.E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., et al. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *Journal of Clinical Investigation* 127, 2719–2724.

Yang, S.-H., Cheng, P.-H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.-J., Cheng, E.C.H., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., et al. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921–924.

Yu, D., Pendergraff, H., Liu, J., Kordasiewicz, H.B., Cleveland, D.W., Swayze, E.E., Lima, W.F., Crooke, S.T., Prakash, T.P., and Corey, D.R. (2012). Single-Stranded RNAs Use RNAi to Potently and Allele-Selectively Inhibit Mutant Huntingtin Expression. *Cell* 150, 895–908.

Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A.P., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L.E., Park, L., Howland, D., Calaminus, C., Gu, X., et al. (2012). A Novel BACHD Transgenic Rat Exhibits Characteristic Neuropathological Features of Huntington Disease. *Journal of Neuroscience* 32, 15426–15438.

Zaghloul, E.M., Gissberg, O., Moreno, P.M.D., Siggins, L., Hällbrink, M., Jørgensen, A.S., Ekwall, K., Zain, R., Wengel, J., Lundin, K.E., et al. (2017). CTG repeat-targeting oligonucleotides for down-regulating Huntingtin expression. *Nucleic Acids Research* 45, 5153–5169.

Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2008). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human Molecular Genetics* 17, 3837–3846.

Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* 11, 155–163.

Zhang, Y., and Friedlander, R.M. (2011). Using non-coding small RNAs to develop therapies for Huntington's disease. *Gene Therapy* 18, 1139–1149.

- Zhang, Y., Li, M., Drozda, M., Chen, M., Ren, S., Mejia Sanchez, R.O., Leavitt, B.R., Cattaneo, E., Ferrante, R.J., Hayden, M.R., et al. (2003). Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. *J. Neurochem.* 87, 101–106.
- Zheng, Z., and Diamond, M.I. (2012). Huntington Disease and the Huntingtin Protein. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 189–214.
- Zuccato, C. (2001). Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science* 293, 493–498.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., et al. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat. Genet.* 35, 76–83.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72, 9873–9880.
- Zwilling, D., Huang, S.-Y., Sathyaikumar, K.V., Notarangelo, F.M., Guidetti, P., Wu, H.-Q., Lee, J., Truong, J., Andrews-Zwilling, Y., Hsieh, E.W., et al. (2011). Kynurenine 3-Monooxygenase Inhibition in Blood Ameliorates Neurodegeneration. *Cell* 145, 863–874.





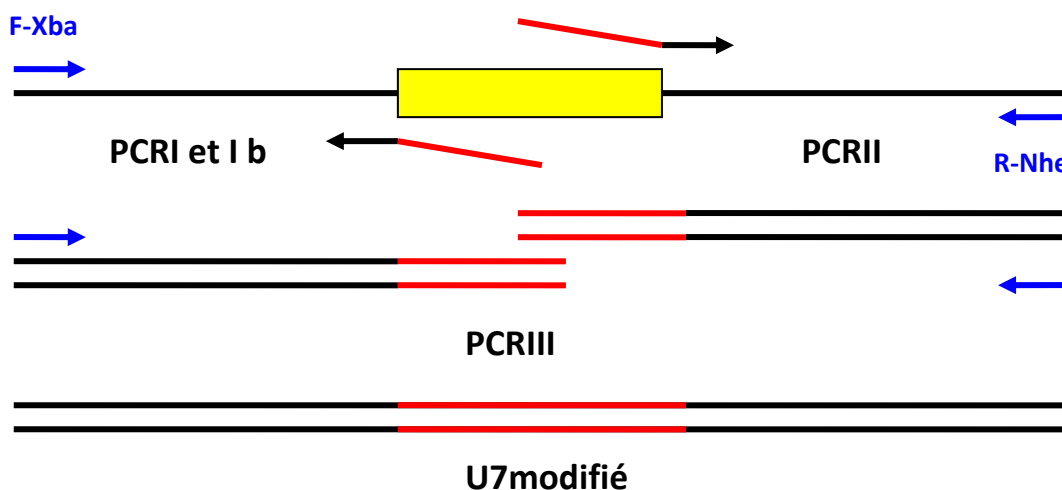
# Annexes



## I. Fiches techniques

### A. N°1 : Construction des U7snRNA modifiés

#### Exemple du U7\_ex12\_ASDS



- Designer les amorces permettant l'introduction des séquences antisens dans la cassette U7snRNA par mutagenèse dirigée
  - Séquences des amorces pour U7 murin :  
 F-Xba : 5'-GGGTCTAGATAACAACATAGGAGCTGTGA-3'  
 R-Nhe : 5'-AAAGCTAGCCACAACGCGTTTCCTAGGA -3'
  - Séquences des oligonucléotides/dans la cassette U7  
 AON12.AS : UUCACUGAGGCUGAAGACAG/TTCACTGAGGCTGAAGACAG  
 AON12.DS : CCCACUUACAAUUUCAGAAC/CCCACTTACAATTCAGAAC
  - Séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse :  
 U7\_ex12\_ASDS\_R1 : 5'- TTCTGAAATTGTAAGTGGGTTGCGGAAGTGCCTGTGTA -3'  
 U7\_ex12\_ASDS\_R1b : 5'- AGCCTCAGTGAAGTTCTGAAATTGTAAGTGGGTTG -3'  
 U7\_ex12\_ASDS\_F : 5'- TCACTGAGGCTGAAGACAGAATTTTTGGAGCAGGTTTTCT -3'
- Réaliser les PCR I et II, déposer les échantillons sur gel d'agarose à 1%, extraire sur gel les produits de PCR (286pb pour la PCR I et 169pb pour la PCR II) puis les resuspendre dans 30µL d'eau après purification avec le kit PCR clean up (Macherey Nagel)

- Mix pour la PCR I :

Master Mix GoTaq (Promega)	25µL
F-Xba	1µL
U7_ex12_ASDS_R1	1µL
Eau	22µL
mU7	1µL (environ 100ng)

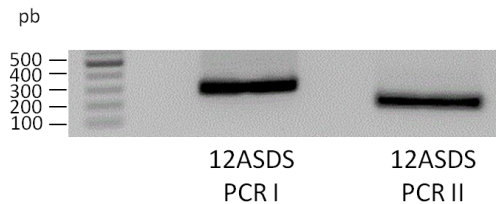
- Mix pour la PCR II :

Master Mix GoTaq (Promega)	25µL
R-Nhe	1µL
U7_ex12_ASDS_F	1µL
Eau	22µL
mU7	1µL (environ 100ng)

- Programme PCR I et II :

95°C 5'  
 95°C 30'' }  
 55°C 30'' } x30  
 72°C 1' }  
 72°C 7'

- Exemple de résultats :



- Réaliser la PCR I b sur le produit de la PCR I, déposer les échantillons sur gel d'agarose à 1%, extraire sur gel les produits de PCR à la taille attendue (299pb) puis les resuspendre dans 30µL d'eau après purification avec le kit PCR clean up (Macherey Nagel)

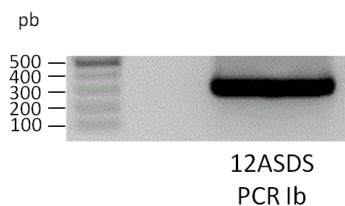
- Mix pour la PCR I b :

Master Mix GoTaq (Promega)	25µL
F-Xba	1µL
U7_ex12_ASDS_R1b	1µL
Eau	22µL
PCR I	1µL (environ 100ng)

- Programme PCR I b :

95°C 5'  
 95°C 30'' }  
 55°C 30'' } x30  
 72°C 1' }  
 72°C 7'

- Exemple de résultats :



- Réaliser la PCRIII sur les produits des PCR I b et II, déposer les échantillons sur gel d'agarose à 1% (à 60V pendant 90min), extraire sur gel les produits de PCR à la taille attendue (456pb) puis les resuspendre dans 30µL d'eau

- Mix pour la PCRIII :

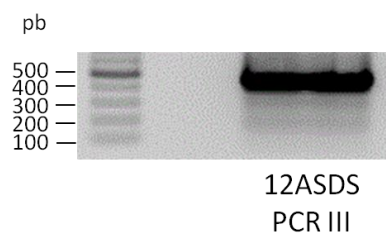
Master Mix GoTaq (Promega)	25µL
F-Xba	1µL
R-Nhe	1µL
Eau	22µL
PCR I b et PCR II	1µL (environ 100ng) de chaque

- Programme PCRIII :

95°C 5'  
 95°C 30"  
 55°C 30"  
 72°C 1'  
 72°C 7'

} x30

- Exemple de résultats :



- Séquence de la cassette U7snRNA après mutagenèse dirigée pour ajouter les séquences antisens. En orange : séquences des amorces F-Xba et R-Nhe, surlignées en cyan et magenta : séquences des oligonucléotides ajoutées par mutagenèse.

GGGTCTAGATAACAACATAGGAGCTGTGATTGGCTGTTTTAGCCAATCAGCACTGACTCATTGTCAT  
 AGCCTTTACAAGCGGTCACAACTCAAGAAACGAGCGGTTTTAATAGTCTTTTAGAATATTGTTTATC  
 GAACCGAATAAGGAACTGTGCTTTGTGATTCACATATCAGTGGAGGGGTGTGGAAATGGCACCTTG  
 ATCTCACCTCATCGAAAGTGGAGTTGATGTCCTTCCCTGGCTCGCTACAGACGCACTTCCGCAACCC  
 ACTTACAATTCAGAACTTCACTGAGGCTGAAGACAGAAATTTTGGAGCAGTTTTCTGACTTCGGTC  
 GGAAAACCCCTCCCAATTTCACTGGTCTACAATGAAAGCAAACAGTTCTCTTCCCGCTCCCCGGTG  
 TGTGAGAGGGGCTTTGATCCTTCTGTTTCTAGGAAACGCGTATGTGGCTAGCTTT



- Cloner ensuite le produit de PCR purifié dans un vecteur pSMD2 :
  - Digérer le produit de PCR obtenu avec les enzymes de restriction Xba et Nhe (U7 murin) ou Nhe seulement (U7 humain) et le vecteur pSMD2 par l'enzyme Xba en préparant les mix suivants :

	<b>Produit PCR : Xba/Nhe</b>	<b>pSMD2 : Xba</b>
CutSmart 10 X	5µL	6µL
BSA 10X	5µL	6µL
Xba	1µL	3µL
Nhe	1µL	
DNA	28µL	4µL
H2O	10µL	41µL

- Incuber 3h à 37°C extraire sur gel les produits de PCR à la taille attendue puis les resuspendre dans 30µL d'eau après purification
- Déphosphoryler le vecteur à l'aide d'une phosphatase (Biolabs) en préparant le mix suivant :

pSMD2 (Vecteur)	28µL
Tampon (pour AP) 10 X	3,5µL
Antarctic phosphatase	1µL
H2O	2,5µL

- Incuber 1h à 37°C puis inactiver 30 min à 65°C
- Réaliser ensuite la ligation des produits digérés obtenus à l'aide d'une ligase (Biolabs) en préparant le mix suivant :

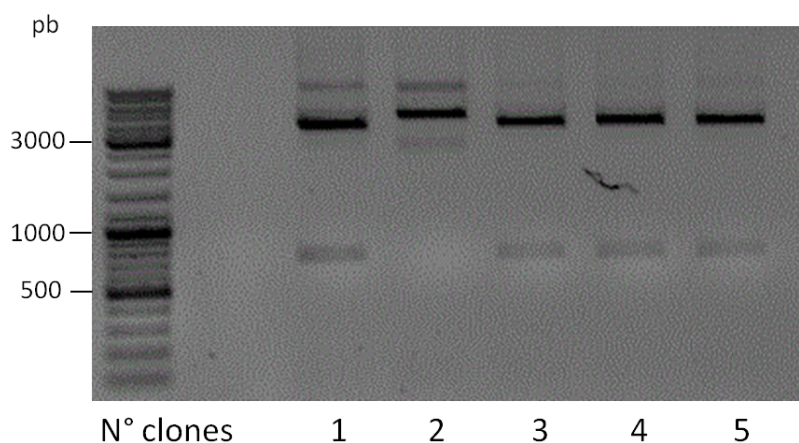
Vecteur pSMD2	50ng
Insert obtenu	30ng
Eau	QSP 9µL
Tampon 2X	10µL
Ligase	1µL

- Incuber 5 à 8 min à RT puis 5 minutes sur glace
- Transformer des bactéries compétentes par choc thermique :
  - Ajouter 5µL du mélange de ligation à 50µL de bactéries compétentes
  - Incuber dans la glace 15 à 30 min
  - Incuber 30 sec à 42°C (choc thermique) puis 2 min dans la glace
  - Ajouter 450µL de milieu de culture bactérienne SOC puis incuber pendant 30min à 37°C
  - Etaler ces bactéries sur une boîte de Pétri LB + ampicilline et incuber sur la nuit à 37°C

- Extraire les U7snRNA modifiés :
  - Repiquer 5 à 8 clones dans 3mL de LB + ampicilline
  - Extraire l'ADN plasmidique de chaque clone à l'aide d'un kit Miniprep (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel)
  - Digérer les clones obtenus avec l'enzyme Aval qui coupe dans les ITR libérant ainsi la cassette (tailles attendues : 4kb et 750pb) :

CutSmart 10 X	2 $\mu$ L
BSA 10X	2 $\mu$ L
ADN plasmidique	3 $\mu$ L
Aval	1 $\mu$ L
Eau	12 $\mu$ L

- Incuber 1 à 2h à 37°C puis déposer les échantillons sur gel d'agarose à 1% (à 90V pendant 30min)
- Exemple de résultats :



- Confirmer les clones d'intérêt par séquençage
- Cultiver un de ces clones dans 250 ml de milieu LB + ampicilline
- Extraire puis purifier l'ADN plasmidique du clone sélectionné à l'aide d'un kit Maxiprep (NucleoBond® Xtra Maxi, Macherey-Nagel) puis confirmer son profil par digestion enzymatique avec Aval (en suivant le protocole précédent) et par séquençage

## B. N°2 : Production de vecteurs lentiviraux

J0 : Changer le milieu de culture de cellules HEK293T à 80% de confluence 2h avant la transfection (milieu DMEM complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF)) puis quadri-transfection (50µg total, quantités stœchiométriques) avec :

- un plasmide d'encapsulation et intégration du génome (pMDLg/pRRE)
- un plasmide de translocation nucléaire (pRSV-Rev)
- un plasmide d'enveloppe VSV-G (pMD2-G)
- un plasmide portant le transgène flanqué par deux LTR (Long Terminal Repeat)
- Ajouter 680 µl de TE 0,1X (pH 8.0) + 346 µl d'H<sub>2</sub>O MQ (15 ou 18 MΩ) + 114 µl de CaCl<sub>2</sub> à 2,5M : Tube « ADN »
- Dans un autre tube, placer le volume équivalent du « tube ADN » de tampon HBS 2X : Tube « HBS »
- Ajouter le contenu du « tube ADN » goutte à goutte dans le « tube HBS » en homogénéisant doucement l'ensemble
- Laisser incuber la suspension de transfection entre 5 minutes et 30 minutes max
- Ajouter le mix goutte à goutte dans la boîte de culture et incuber sur la nuit à 37°C

J1 : Changement de milieu et 1<sup>ère</sup> récolte de vecteurs

- Début de journée : éliminer le milieu de culture de la veille et le remplacer par 14 ml de milieu frais (DMEM + 10% SVF + 1% PS)
- Fin de journée : récolter le surnageant de la boîte de culture et remettre 14 ml de milieu frais

J2 : 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> récoltes de vecteurs

- Début de journée : récolter le surnageant de la boîte de culture et remettre 14 ml de milieu frais
- Fin de journée : récolter le surnageant de la boîte de culture et remettre 14 ml de milieu frais

J3 : 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> récoltes de vecteurs

- Début de journée : récolter le surnageant de la boîte de culture et remettre 14 ml de milieu frais
- Fin de journée : récolter le surnageant de la boîte de culture

J4 : Purification des vecteurs lentiviraux

- Les récoltes sont centrifugées à 3500 x g pendant 20 minutes et filtrées (0,45 µm)
- Les clarifiats sont déposés dans des tubes UltraClear (Beckman Coulter) de 38 ml et ultracentrifugés à 32000 rpm pendant 2h à 16°C
- Les surnageants sont éliminés et les culots repris dans 50 µl de tampon PBS 1X
- Les vecteurs lentiviraux sont stockés à -80°C.

### C. N° 3: Production de vecteurs AAV

J0 : Ensemencer des cellules 293T en boîte de culture 150 mm avec du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complétementé avec 10% de sérum de veau foetal (SVF)

J3 : Ensemencer des cellules 293T en Hyperflask®

J4 : Tri-transfecter (500µg total, quantités stœchiométriques) des cellules 293T avec :

- un plasmide Helper (pXX6) contenant les gènes helpers pour la réplication des génomes AAV
- un plasmide portant les séquences Rep et Cap de l'AAV
- un plasmide portant le transgène flanqué par deux ITR (Inverted Terminal Repeat)
- Ajouter 10mL de solution de NaCl à 150mM puis 1,25mL de PEI (PolyEthylenImine)
- Incuber 20 minutes à température ambiante
- Ajouter le mix ADN-PEI à 500 ml de milieu de transfection (DMEM GlutaMAX™ w/o pyruvate à 4,5 g/L glucose + 2% FBS + 1% PS)
- Incuber l'Hyperflask® avec ce milieu à 37°C/5% CO<sub>2</sub> pendant 72 heures

J7 : Récolter et traiter les AAV

- Lyser les cellules en ajoutant de la RNase à 5µg/ml final et du Triton à 0.5% final puis incuber 1h à 37°C
- Pré-clarifier le milieu en le centrifugeant à 3 500 g 16°C 30min
- Clarifier le surnageant en le passant sur un filtre 0,45µm
- Concentrer le milieu clarifié sur une colonne de filtration à flux tangentiel (TFF) de 500kDa jusqu'à obtention d'un volume de 60mL
- Préparer un gradient de iodixanol : 3ml de 25% d'iodixanol, 4 ml de 40% et 2 ml de 60%, ajouter le milieu concentré puis centrifuger à 700 000 rpm pendant 20min à 16°C
- Collecter les AAV entre les différentes couches de iodixanol
- Concentrer ces AAV à l'aide d'un filtre Amicon® à 10 000 Da, centrifuger à 3500g à 8°C jusqu'à élimination complète du iodixanol et obtention de 250µL d'AAV concentrés
- Déterminer le titre des AAV par qPCR après traitement à la DNase puis à la protéinase K

Prod AAV-U7	12.3.4	13ASDS	13.1.2	CAG12	CAG19	CAG7DS	GFP
Titre (vg/ml)	8,2E+11	4,4E+11	1,2E+12	1,8E+12	9,9E+11	7,8E+12	2,6E+12

#### **D. N°4 : Culture de fibroblastes**

- Types cellulaires utilisés :
  - GM02171 (17/17 CAG)
  - GM02147 (43/15 CAG)
  - GM03621 (59/18 CAG)
  - GM09197 (151/21 CAG)
- Milieu de prolifération :
  - F10 + 20% FBS + 1% Pénicilline-Streptomycine
- Incubation :
  - 37°C, atmosphère humide, 5% CO<sub>2</sub>
- Milieu de congélation :
  - FBS + 10% DMSO

## E. N°5 : Transfection et transduction de fibroblastes

- **Transfection d'oligonucléotides antisens**

J0 :ensemencer 120 000 cellules/puits dans une plaque 6 puits.

J1 :Après avoir renouvelé le milieu de prolifération, transfecter les cellules à 70-90% de confluence avec 3µg d'oligonucléotides antisens à 0,1µg/µl et 3µL de PLUS Reagent® en milieu Opti-MEM™ (Gibco®) ajoutés, après 5min d'incubation, à 12µL de Lipofectamine® en milieu Opti-MEM™ (Gibco®) également.

J3 :Décoller les cellules avec de la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco®) 48h après la transfection afin d'extraire l'ARN des cellules.

J4 :Décoller les cellules avec de la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco®) 72h après la transfection afin d'extraire les protéines des cellules en regroupant 2 puits.

- **Transduction de lentivirus-U7snRNA**

J0 :ensemencer 60 000 cellules/puits dans une plaque 12 puits.

J1 :Après avoir renouvelé le milieu de prolifération, ajouter 20µl de lentivirus-U7snRNA.

Récolter les cellules lorsqu'il y a l'équivalent d'un puits de plaque 6 puits pour l'ARN, et de deux puits pour les protéines.

## F. N°6 : Géotypage

- Extraire l'ADN de bouts de queues de nouveaux-nés murins en ajoutant de la soude à 50mM puis en dénaturant 35 minutes à 98°C et enfin en neutralisant par ajout de Tris-HCl 1M pH 8,2
- Préparer les mix pour amplifier les exons 7-8 humains et le *Gapdh* murin et réaliser le programme PCR suivant :

GoTaq (Promega) MasterMix 2X	12,5µL
Primer F à 10µM	0,5µL
Primer R à 10µM	0,5µL
Eau	8,5µL
ADN	3µL

- Programme PCR géotypage (ex7-8 et *Gapdh* murin) :

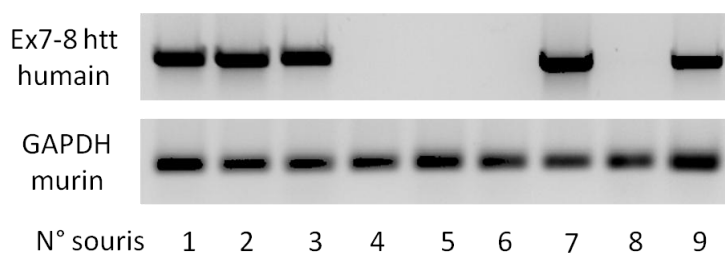
95°C 5'  
 95°C 30'' } x30  
 60°C 30'' }  
 72°C 1' }  
 72°C 7'

- Séquences des amorces utilisées :

F_ex7 <i>HTT</i> humain	5'-TGCCAGCACTCAAGAAGGACAC-3'
R_ex8 <i>HTT</i> humain	5'-CACGCCAAGAATCAGCAGAGTGG-3'
F_ <i>Gapdh</i> murin	5'-TGACGTGCCGCCTGGAGAAA-3'
R_ <i>Gapdh</i> murin	5'-AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'

- Déposer les échantillons sur gel à 1,5% d'agarose et analyser les résultats obtenus pour sélectionner les animaux porteurs du transgène

- Exemple de résultats obtenus sur gel d'agarose 1,5% :



### G. N°7 : Injection intracérébroventriculaire (ICV)

- Injecter par voie intra-péritonéale 2 anesthésiques systémiques (kétamine à 90mg/kg et xylazine à 10mg/kg)
- Injecter en sous-cutané un anesthésique local (Bupivacaïne 0,25% à 8mg/kg) autour de la zone d'injection préalablement rasée
- Placer la souris sur une console de stéréotaxie équipée d'un tapis chauffant et appliquer un gel ophtalmique hydratant sur sa cornée
- Localiser le bregma et perforer le crâne de l'animal selon les coordonnées suivantes : Rostrocaudal : -0,2 mm ; Médiolatéral : -1 mm ; Dorsoventral : -2,5 mm
- Injecter les molécules à 0,5µL/min dans le ventricule latéral droit de l'animal à l'aide d'une seringue de précision Hamilton 1701 SN 32/25/4 couplée à un pousse-seringue automatique
- Injecter un antalgique systémique en sous-cutanée (Buprénorphine à 0,1mg/kg)
- Reboucher l'ouverture du crâne avec de la cire stérile et suturer le scalp avec du fil non résorbable
- Désinfecter la plaie à l'aide d'un antiseptique cutané

Au moment du sacrifice :

- Isoler le cerveau
- Séparer le côté ipsilatéral (droit) du côté contralatéral (gauche)
- Isoler pour chaque hémisphère : le cortex, le striatum, l'hippocampe et le cervelet
- Séparer chaque partie du cerveau en deux (un servira à étudier l'ARN, et l'autre les protéines) et les placer dans des tubes à billes
- Placer les tubes à billes dans l'azote liquide
- Conserver les échantillons à -80°C



## H. N°8 : Extraction d'ARN à partir de cellules/tissus

- Ajouter 0,5mL/1mL de Trizol par échantillon de cellules (1 puits de plaque 6 puits) / tissus (morceau de chaque structure cérébrale étudiée)
- Homogénéiser le lysat cellulaire par pipetage/par utilisation d'un Precellys® avec des billes de céramique (1,4mm de diamètre) et incubé 5min à température ambiante
- Ajouter 0,1mL/0,2mL de chloroforme puis agiter vigoureusement pendant 15s
- Incuber 3min à température ambiante et centrifuger à 12 000 g pendant 15min à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 0,25mL/0,5mL d'éthanol à 70%
- Transférer sur colonne Macherey-Nagel
- Centrifuger à 12 000 g pendant 30s à température ambiante
- Jeter le surnageant puis ajouter 350µL de tampon MDB (Membrane Desalting Buffer) sur la colonne
- Centrifuger à 12 000 g pendant 1min et jeter le surnageant
- Ajouter 95µL de DNase sur la colonne et incubé 15min à température ambiante
- Ajouter 200µL de tampon RA2 sur la colonne puis centrifuger 30s à 11 000 g
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur puis ajouter 600µL de tampon RA3 sur la colonne
- Centrifuger à 11 000 g pendant 30s puis placer la colonne dans un nouveau tube collecteur
- Ajouter 250µL de tampon RA3 sur la colonne puis centrifuger à 11 000 g pendant 2min
- Placer la colonne sur un tube de 1,5mL et ajouter 30µL (cellules et hippocampe) / 40µL (striatum) / 60µL (cortex et cervelet) d'eau RNase-free
- Eluer en centrifugeant à 11 000 g pendant 1min
- Doser au NanoDrop

### I. N°9 : Analyse par RT-PCR

- Réaliser une reverse-transcription sur les ARN à l'aide du kit SuperScript III (Invitrogen) :

- Préparer le mix 1 suivant, incuber 5min à 65°C puis 1min sur glace

ARN	1µg
Random Hexamers Primers	1µl
10 mM dNTP	1µl
Eau	qsp 10µl

- Préparer un deuxième mix (mix 2, composition ci-dessous) puis ajouter 10µL de mix 2 dans le mix 1

10 X RT Buffer	2µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4µL
0.1 M DTT	2µL
RNAse OUT	1µL
SuperScript III	1µL

- Suivre le protocole suivant puis incuber 10min à 25°C 50min à 50°C 5min à 58°C sur glace
  - Ajouter 1µL de RNase H puis incuber 20min à 37°C
- Réaliser différentes PCR (programmes précisés ci-dessous) en préparant le mix suivant sur les ADNc obtenus puis déposer les échantillons sur gel à 1,5% d'agarose et analyser les résultats par quantification avec ImageJ de l'intensité des bandes obtenues :

- Mix préparé :

GoTaq (Promega) MasterMix 2X	25µL
Primer F à 10µM	1µL
Primer R à 10µM	1µL
Eau	21 µL
ADNc	2µL de RT (à partir d'1µg d'ARN)

- Programme PCR exon 1/1bis (amplification des répétitions CAG) :

95°C 5'  
 95°C 30'' } x35  
 60°C 30'' }  
 72°C 1' }  
 72°C 7'

F_ex1bis	5'-ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT-3'
R_ex1bis	5'-TGAGGCAGCAGCGGCTG-3'

Cellules / Souris	Nombre répétitions CAG	Taille fragment PCR Ex1-1
<b>GM02147</b>	43	263
	15	179
<b>GM02171</b>	17	185
	17	185
<b>GM03621</b>	59	311
	18	188
<b>GM09197</b>	151	587
	21	197
<b>YAC128</b>	128	518

- Programme PCR exon 1/5 (après les répétitions CAG) :

95°C 5'  
 95°C 30'' }  
 59°C 30'' } x30  
 72°C 1' }  
 72°C 7'

F_ex1tris	5'-GCCTCCTCAGCTTCCTCAG-3'
R_ex5	5'-CTGCATTCTGAGGCCGAAC-3'

- Programme PCR exon 9/16 (saut des exons 12 et 13) :

95°C 5'  
 95°C 30'' }  
 59°C 45'' } x27  
 72°C 1'10'' }  
 72°C 7'

F_ex9	5'-GAGCTTCTGCAAACCCTGAC-3'
R_ex16	5'-CTTCACGCTGACCCTCACAT-3'

Saut d'exon	ΔEx12 partiel	ΔEx12 total	ΔEx13	ΔEx12 partiel + Ex13	ΔEx12 total + Ex13
<b>Taille PCR Ex9/16 (pb)</b>	833	627	844	709	503

- Programme PCR exon 7/8 :

95°C 5'  
 95°C 30''  
 60°C 30'' } x27  
 72°C 1'  
 72°C 7'

F_ex7	5'-TGCCAGCACTCAAGAAGGACAC-3'
R_ex8	5'-CACGCCAAGAATCAGCAGAGTGG-3'

- Programme PCR *Gapdh* murin :

95°C 5'  
 95°C 30''  
 60°C 30'' } x25  
 72°C 30''  
 72°C 7'

F_ <i>Gapdh</i> murin	5'- TGACGTGCCGCCTGGAGAAA-3'
R_ <i>Gapdh</i> murin	5'- AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'

- Programme PCR *GAPDH* humain :

95°C 5'  
 95°C 30''  
 59°C 30'' } x25  
 72°C 30''  
 72°C 7'

F_ <i>GAPDH</i> humain	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
R_ <i>GAPDH</i> humain	5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3'

## J. N°10 : Analyse par PCR quantitative

- Réaliser une reverse-transcription à partir d'1µg d'ARN selon la fiche technique précédente.
- Réaliser les qPCR en préparant le mix suivant pour les 3 réactions à faire (Ex7-8 et Ex64-65 du transcrit *HTT* humain, et *Gapdh* murin pour les échantillons de souris ou *GAPDH* humain pour les échantillons provenant de cellules) :

- Mix préparé :

SYBR Green MasterMix 2X (BioRad)	5µL
Primer F à 10µM	0,3µL
Primer R à 10µM	0,3µL
Eau	1,4 µL
ADNc dilué au 1/4	3µL de RT (à partir d'1µg d'ARN)

- Programme de qPCR :

50°C 2'

95°C 10'

95°C 15''

60°C 1'

Lecture

} x40

- Séquences des amorces utilisées :

F_ex7 <i>HTT</i> humain	5'-TGCCAGCACTCAAGAAGGACAC-3'
R_ex8 <i>HTT</i> humain	5'-CACGCCAAGAATCAGCAGAGTGG-3'
F_ex64 <i>HTT</i> humain	5'-CGACAGCGAGTCAGTGATTG-3'
R_ex65 <i>HTT</i> humain	5'-ACCACTCTGGCTTCACAAGG-3'
F_ <i>Gapdh</i> murin	5'-TGACGTGCCGCCTGGAGAAA-3'
R_ <i>Gapdh</i> murin	5'-AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'
F_ <i>GAPDH</i> humain	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
R_ <i>GAPDH</i> humain	5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

### **K. N°11 : Extraction de protéines à partir de cellules/tissus**

- Resuspendre les cellules dans 40µL (pour 2 puits de plaque 6 puits) et les échantillons de cerveau dans 250µL (cervelet), 200µL (cortex) ou 100µL (hippocampe et striatum) de tampon de lyse (RIPA avec inhibiteur de protéases 25X, Roche)
- Pour les échantillons cellulaires, homogénéiser par pipetage
- Pour les échantillons tissulaires, ajouter des billes de céramique (1,4mm de diamètre) et broyer deux fois 8s à 10 000rpm au Precellys® puis centrifuger à 6 000 rpm pendant 5s à 4°C
- Incuber 10/30min sur glace
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 10min à 4°C puis récupérer le surnageant
- Doser les échantillons à l'aide d'un kit BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, # 23225, Thermo Scientific™) et lire les résultats au spectrophotomètre à 562nm (FLUOstar® Omega Microplate Reader, BMG LABTECH)

## L. N°12 : Western Blot

### Migration

- Préparer 20µg d'échantillons protéiques en ajoutant du LDS (NuPAGE®, 4X, ThermoFisher Scientific) et un agent réducteur (NuPAGE®, 10X, ThermoFisher Scientific) QSP 20µL de tampon de lyse (RIPA avec inhibiteur de protéases (25X, Roche)
- Incuber à 70°C pendant 10min puis laisser refroidir sur glace
- Déposer les échantillons sur gel Tris-Acétate 3-8% (NuPAGE®, 15 puits, 1mm, ThermoFisher Scientific)
- Faire migrer pendant 2h à 80V puis 3h à 110V en tampon de migration Tris-acétate SDS (NuPAGE®, 20X, ThermoFisher Scientific)

### Transfert humide

- Transférer 2h à 200mA en chambre froide sur membrane de nitrocellulose (Odyssey®, LI-COR®) dans une cuve sous agitation et remplie de tampon de transfert (25mL du tampon de transfert 20X et 50mL d'éthanol 100% QSP 500mL d'eau)
- Vérifier le bon transfert des protéines sur la membrane à l'aide d'un kit de marquage réversible des protéines (MemCode™ Reversible Protein, ThermoScientific)

### Marquage des protéines d'intérêt

- Utiliser l'iBind™ Flex Western Device (ThermoFisher Scientific) pour saturer la membrane et incuber les anticorps marquant la huntingtine (MAB2166 pour HTT murine et humaine et MAB1574 pour muHTT ; Sigma) au 1/1 000 et la vinculine (V9131, clone mVIN-1, Sigma) au 1/20 000 puis l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome vert (IRDye® 800CW Goat-anti-Mouse Antibody, LI-COR®) au 1/2 000

### Révélation

- Révéler à l'aide d'un scanner Odyssey® CLx (LI-COR®)

## II. Revue publiée dans le journal Genes



Review

# Viral Vector-Mediated Antisense Therapy for Genetic Diseases

Marine Imbert <sup>†</sup>, Gabriella Dias-Florencio <sup>†</sup> and Aurélie Goyenvalle <sup>\*</sup>

INSERM U1179, Université de Versailles St-Quentin en Yvelines and Université Paris Saclay,  
2 Avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France; marine.imbert2@uvsq.fr (M.I.);  
gabriella.dias-florencio-leite@uvsq.fr (G.D.-F.)

<sup>\*</sup> Correspondence: aurelie.goyenvalle@uvsq.fr; Tel.: +33-01-704-29432

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Selvarangan Ponnazhagan

Received: 28 October 2016; Accepted: 17 January 2017; Published: 26 January 2017

**Abstract:** RNA plays complex roles in normal health and disease and is becoming an important target for therapeutic intervention; accordingly, therapeutic strategies that modulate RNA function have gained great interest over the past decade. Antisense oligonucleotides (AOs) are perhaps the most promising strategy to modulate RNA expression through a variety of post binding events such as gene silencing through degradative or non-degradative mechanisms, or splicing modulation which has recently demonstrated promising results. However, AO technology still faces issues like poor cellular-uptake, low efficacy in target tissues and relatively rapid clearance from the circulation which means repeated injections are essential to complete therapeutic efficacy. To overcome these limitations, viral vectors encoding small nuclear RNAs have been engineered to shuttle antisense sequences into cells, allowing appropriate subcellular localization with pre-mRNAs and permanent correction. In this review, we outline the different strategies for antisense therapy mediated by viral vectors and provide examples of each approach. We also address the advantages and limitations of viral vector use, with an emphasis on their clinical application.

**Keywords:** antisense therapy; snRNA; viral vectors; splice-switching approaches

### 1. Introduction

The use of antisense therapy to target RNA offers an effective approach for the treatment of genetic diseases. Antisense oligonucleotides (AOs) are short single-stranded nucleotide sequences, able to bind pre-mRNA and mRNA to modulate gene expression. Pioneered for therapeutic use by Stephenson and Zamecnik in 1978 [1], oligodeoxyribonucleotides were first used to prevent viral replication through inhibiting the translation of viral proteins. However, since this initial research, later attempts have demonstrated that short oligonucleotides are readily degraded by nucleases thereby reducing their efficacy. In order to avoid degradation, AOs may be chemically modified e.g., by phosphorothioate linkage, 2'-O-methyl or 2'-O-methoxyethyl. Several modified AOs have demonstrated encouraging outcomes for the treatment of different inherited diseases, such as muscular dystrophies or spinal muscular atrophy. However, synthetic antisense oligonucleotides present several disadvantages including limited cellular-uptake, efficacy and specificity for targeted delivery, and rapid clearance from the system following intravenous (IV) injections. These characteristics drive the need for repeated administrations in order to achieve a therapeutic response, with the negative consequence of accumulation in tissues and associated-toxicity. In order to achieve a long-lasting therapeutic effect without repeated injections, a vectorized system is required. Indeed, it is possible to modify small nuclear RNAs (snRNAs) with specific antisense sequences, and introduce them into viral vectors to get a long-term correction. In order to achieve effective intracellular expression of



the antisense sequence, three main parameters must be considered: tissue tropism, in vivo stability, and subcellular localization of the molecular tools with the target pre-mRNA, all of which may be addressed using a snRNA-based approach.

In this review, we shall discuss the emergence of the snRNA system to shuttle antisense sequences with the use of different viral vectors, and provide examples of therapeutic applications for genetic diseases. Then we summarize the strengths and weaknesses of this strategy compared with AOs and other gene therapy approaches.

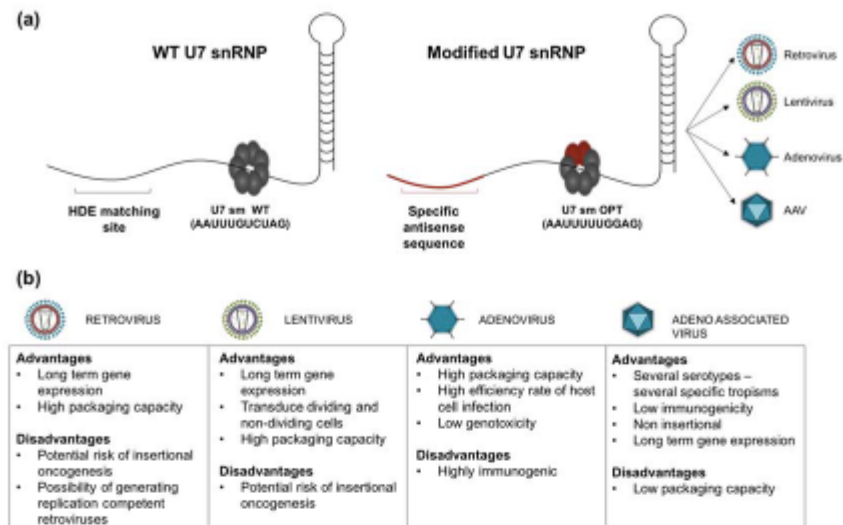
## 2. The snRNA System

### *The Development of the snRNA Shuttle System*

snRNAs are involved in the processing of pre-mRNA and are associated with specific proteins, called Sm core to form a complex of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) (Figure 1a). U7 small nuclear RNA (U7 snRNA) is a component of the small nuclear ribonucleoprotein complex (U7 snRNP), normally involved in histone pre-mRNA 3' end processing, through a complementary sequence to the histone downstream element (HDE). U7 snRNA can be used as a tool for pre-mRNA splicing modulation by modifying the binding site for Sm/Lsm (Sm-like) proteins [2]. Schumperli and colleagues showed that converting the Sm binding site of U7 snRNA (U7 Sm WT) into the consensus sequence derived from spliceosomal snRNPs (U7 SmOPT) resulted in the assembly of the Sm proteins D1 and D2 instead of the usual Lsm10 and Lsm11. This modification leads to the accumulation of U7 Sm OPT snRNPs in the nucleus and prevents the action of this complex on histone RNA processing [3,4]. Based on these observations, it has been suggested that modified U7 snRNPs carrying antisense sequences complementary to specific splicing sites could be suited for the manipulation of targeted genes. The antisense sequence carried by a snRNP will naturally accumulate in the nucleus where splicing occurs, and will be protected from degradation.

Similar studies have also investigated the use of modified U1 snRNA [5] and U6 snRNA [6,7] to target nuclear splicing sites. U1 and U6 are part of the spliceosome, along with U2, U4, U5 and several proteins [8]. Each snRNAs, except U6, is forming a complex with Sm core proteins to form a snRNP. The attractiveness of U1 as a therapeutic target is due to the fact that U1 snRNA expression is 6-fold higher than U7 snRNA expression per gene copy and because of its central role in splicing. Research however suggests that targeting U1 snRNA over the other snRNA constructs does not result in superior efficacy, perhaps due to the inability of the modified U1 to compete with the largely expressed wild-type U1 for specific binding sites [2,5].

The U7 smOPT snRNP technology was first tested in an in vitro model of  $\beta$ -thalassemia. This disease is caused by several mutations in the *HBB* gene, that codes for the  $\beta$ -globin protein. The model used in this study is a HeLa cell line carrying a T/G substitution in the position IVS2-705 of the human  $\beta$ -globin gene, that leads to abnormal splicing and  $\beta$ -globin deficiency. Results indicated that the use of a U7 snRNA carrying an antisense sequence targeting this mutation corrected more than 50% of aberrant splicing and subsequent re-expression of full-length  $\beta$ -globin protein [9]. Since this development, U7 smOPT snRNPs have been successfully exploited to correct mutations in a number of inherited diseases, including Duchenne muscular dystrophy (DMD) and spinal muscular atrophy (SMA) which are detailed below.



**Figure 1.** (a) Structure of U7 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). snRNPs are the complexes formed by specific snRNA and the protein complex called Sm core, composed of seven Sm or Lsm (Sm-like) proteins encircled around the snRNA Sm binding site. The hairpin at the 3' end plays a crucial role in snRNP stabilisation. The exposed 5' end of the U7 snRNA is complementary of the histone downstream element (HDE) found in histone pre-mRNA, and is central in histone RNA 3' end processing (WT U7 snRNP). The Sm core of the U7 snRNP consists of seven proteins: Lsm10, Lsm11, B/B' (alternative splicing products), D3, E, F and G. For therapeutic use, U7 snRNA is genetically modified to modulate the splicing in different diseases. The modified U7 snRNP carries a different antisense sequence (specific to the target gene) and the specific U7 Sm binding site is replaced by the consensus sequence derived from the spliceosomal snRNPs (U7 Sm OPT); this modification results in more efficient accumulation of the U7 snRNP in the nucleus and the inability to cleave the histone pre-mRNA target due to the replacement of Lsm 10 and 11 by D1 and D2 Sm proteins. The modified U7 snRNA can also be equipped with a 5' tail carrying an exonic splicing enhancer (ESE) or silencer (ESS) sequence (bifunctional), able to bind specific splicing enhancer/silencer (SE/SS) factors optimizing the effect of exon-skipping or exon reinclusion; (b) Advantages and inconvenient of main viral vectors types.

### 3. Therapeutic Applications

#### 3.1. Splicing Modulation

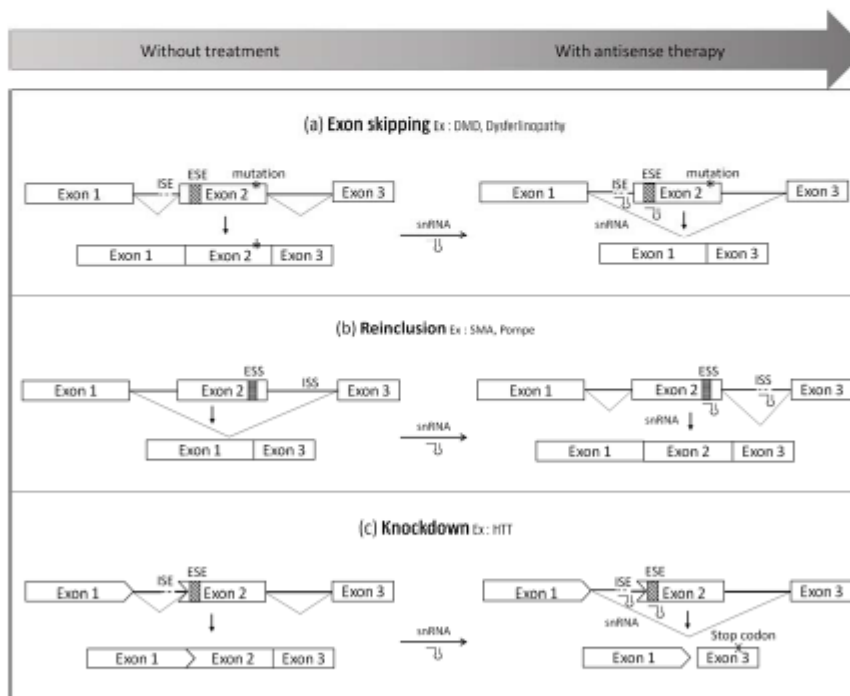
Antisense sequences can be employed to modulate splicing signals (Figure 2). For instance, they can be used to induce either exon-skipping or exon inclusion, or even to disrupt the open reading frame for gene knockdown. The therapeutic application of snRNAs-mediated splicing modulation will be discussed here using diseases such as DMD, SMA and Pompe disease as examples.

##### 3.1.1. Exon-Skipping

- Duchenne muscular dystrophy

DMD is an X-linked recessive form of muscular dystrophy that affects 1 in 3600 boys. This disease is caused by mutations (deletions, duplications, insertions and point mutations) in the DMD gene which mostly disrupt the open reading frame and give rise to non-functional protein. DMD patients display total lack of dystrophin leading to progressive muscle degeneration and premature death. Interestingly, Becker muscular dystrophy (BMD), which is also due to mutations in the dystrophin gene, results in a less severe phenotype. In this case, BMD patients have a truncated dystrophin, internally-deleted but still functional. In contrast with DMD mutations, BMD deletions do not disrupt the open reading

frame [10]. One of the most promising therapeutic approaches for DMD is to convert an out-of-frame transcript into an in-frame transcript which can be accomplished with antisense sequences that mask key splicing sites (Figure 2a). In 1996, Pramono and colleagues reported the first dystrophin exon-skipping in lymphoblastoid cells using antisense oligodeoxynucleotide [11]. Following this encouraging result, several *in vivo* studies provided pre-clinical evidence for the therapeutic potential of an antisense strategy for DMD in different animal models. One model in particular, the *mdx* mouse (carrying a nonsense mutation in exon 23), is being widely used to test the efficacy of the AO approach using various oligonucleotide chemistries such as 2'OMe, phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO), locked nucleic acid (LNA) or peptide nucleic acid (PNA) [12,13]. Two of these chemistries have been evaluated in clinical studies and demonstrated encouraging results (drisapersen [14–19] and eteplirsen [19–23]). However, although dystrophin could be restored at low levels using these synthetic naked oligonucleotide compounds in DMD patients, these studies have failed to show a marked clinical benefit, and while the US Food and Drug Administration (FDA) has surprisingly granted accelerated approval to eteplirsen (a PMO-AO targeting exon 51), additional clinical trials have been requested to confirm the drug's clinical benefit which has not yet been demonstrated. Therefore, there is still a critical need to improve current antisense tools and their delivery which is still very limited. This is particularly important for DMD where all muscles included diaphragm and heart, need to be targeted. Furthermore, repeated injections of AOs are required to maintain splice-switching effects, leading to accumulation in tissues such as kidney and liver in particular and subsequent potential long-term toxicities [24].



**Figure 2.** Splicing modulation mediated by small nuclear RNAs (snRNA) system (a) Exon-skipping. This approach consists in using modified snRNA to hide important splice sites such as the acceptor/donor splice sites or exonic splicing enhancers (ESE) in order to skip the mutated exon. It leads to a truncated protein, which is still functional; (b) Exon reinclusion. This strategy allows the inclusion of an exon by targeting silencer of splicing located in exons (ESS) or in introns (ISS); (c) Knockdown. snRNA can also be used to skip an exon which disrupts the open reading frame in order to create a premature stop codon. This abnormal transcript will be degraded, which will silence the gene expression. DMD, Duchenne muscular dystrophy; SMA, spinal muscular atrophy; HTT, huntingtin.

To overcome these issues several groups have attempted to achieve permanent in situ expression of antisense sequences using viral vectors to maintain therapeutic levels of dystrophin, which has been shown to reach levels of between 15% and 30% of meaningful improvement [25–27]. In 2002, De Angelis and colleagues investigated the use of different snRNAs as an antisense shuttle, based on the work done on *HBB* gene [9,28]. These snRNAs were selected because they are involved in splicing events in the nucleus and are consequently in the same subcellular localization as the target pre-mRNA. This study compared various chimeric snRNAs containing antisense sequences, transducing DMD-derived cells with recombinant retroviral particles which resulted in the efficient skipping of exon 51 and partial rescue of dystrophin synthesis in vitro with U1 snRNA and U7 snRNA. Interestingly, the highest level of exon-skip was obtained with a U7 snRNA vector carrying two antisense sequences, which was called “double target U7” [28]. This result was confirmed by Brun et al. whom have also shown that the double target construct is the most efficient [29]. These in vitro studies have demonstrated the feasibility of using snRNA system as a therapeutic tool for DMD and have encouraged further work on animal models. Goyenvalle and colleagues have constructed a “double target U7” masking two important sites of splicing in introns 22 and 23. This engineered U7 snRNA was injected in *mdx* mice muscles using adeno-associated-virus (AAV) vectors which induced persistent exon 23 skipping that resulted in rescue of dystrophin, and importantly muscle function [30]. Subsequently, the efficacy of AAV-U7 snRNA to induce exon-skipping was evaluated in a much more severe mouse model of DMD, the utrophin/dystrophin double-knockout (dKO), resulting in a remarkable increase of their lifespan [31]. Comparable works were reported by Denti and colleagues using AAV vectors expressing either U1 or U7 snRNAs with local muscle injection in *mdx* mice. The group demonstrated that U1 like U7 is also active in exon-skipping and suitable for expression of antisense molecules [32]. In another study, the same group demonstrated restoration of dystrophin expression in *mdx* mice after systemic injection of AAV-U1 snRNA [33] and the therapeutic benefit was still observed 74 weeks later [34]. Restoration of dystrophin expression in cardiac muscle has also been demonstrated in a large animal model, the golden retriever muscular dystrophy dog (GRMD), using percutaneous transendocardial delivery of AAV-U7 snRNA [35]. Additional studies from Garcia and Moullier have shown correction of the dystrophic phenotype and partial recovery of muscle strength after intramuscular (IM) and IV injections of AAV-U7 snRNA in GRMD dogs [36,37]. Altogether these results have advanced the feasibility of exon-skipping in different animal models, suggesting promising therapeutic outcomes based on AAV-snRNA. Consequently, different groups have tried to identify the most appropriate antisense sequences targeting the human dystrophin pre-mRNA that are able to induce the highest level of skip. Incitti and colleagues have achieved skipping of exon 51 in human cells carrying deletions of exons 48–50 or 45–50 using U1 snRNA [38]. Appreciating that DMD is caused by mutations at different gene loci and that 70% are located between exons 45 and 55, Goyenvalle et al. have designed eleven U7 snRNAs targeting these different human dystrophin exons. They have provided very encouraging results in DMD-patient myoblasts and demonstrated a multiple skipping of at least 3 exons with a single vector in a human DMD transgenic mice (hDMD) [39]. This group has also investigated the use of a ‘bifunctional U7snRNA’ carrying a tail harbouring binding sites for a splicing silencer (hnRNPA1) in addition to the antisense sequence [40].

Altogether, these data have shown the efficacy of AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy for DMD, even if this strategy still faces obstacles to maintain the long-lasting effect for clinical applications (reviewed below in the AAV Section 4.3).

- **Dysferlinopathy**

Exon-skipping approaches mediated by snRNAs have also been successfully applied for dysferlinopathy. Dysferlinopathy is an autosomal recessive disease covering a wide spectrum of phenotypes caused by different mutations in the *DYSF* gene which encodes dysferlin. Some of them are in-frame deletions of exons resulting in typical to severe phenotypes, which inform that these exons cannot be skipped without important deleterious impact. However Sinnreich and colleagues

have reported a physiological exon 32 skip, associated to a very mild phenotype [41]. Since this exon appears at least partially dispensable Wein et al. have managed to induce a high efficiency of exon 32 skipping either with AOs or with Lentivirus-U7 snRNAs [42], which may be a potential therapy for the few patients carrying a mutation in exon 32. These results support the conclusion that this technology could be adapted for other diseases which might benefit from splicing modulation.

### 3.1.2. Exon Inclusion

Antisense technology may also be used to induce re-inclusion of exons that are skipped due to a mutation as represented in Figure 2b.

- Spinal muscular atrophy

SMA is a common fatal autosomal recessive disorder, characterised by degeneration of  $\alpha$ -motoneurons in the anterior horn of the spinal cord leading to progressive muscle weakness, paralysis and often death. SMA is caused by mutations in the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene encoding for SMN protein [43]. The human genome harbors a nearly identical paralog of *SMN1* called *SMN2* which differs by few nucleotides, including a C-to-T transition. This divergence results in exclusion of exon 7 from the *SMN2* transcript which induces the prevalent production of a truncated protein. Only 15% of the *SMN2* mRNA leads to functional full-length SMN protein, which cannot compensate for the lack of *SMN1* [44,45]. Each SMA patient retains at least one *SMN2* copy and German researchers have found an inverse correlation between SMA severity and the number of copies of the *SMN2* gene [46]. These findings highlight the therapeutic potential of exon 7 reinclusion in *SMN2* mRNA. The splicing regulation of this exon has been studied to better understand the mechanism. It appears that exon 7 is a poorly defined exon, with different exonic splicing enhancers (ESE) and silencers (ESS) creating a fragile equilibrium [47,48]. Crucially, introns 6 and 7 also carry important sequences such as intronic splicing enhancers (ISE) and silencers (ISS) which strongly affect the exclusion or inclusion of exon 7 in SMN transcripts [49]. Consequently researchers have designed an AO directed toward the 3' splice site of exon 8 demonstrating modulation of *SMN2* splicing with an increase of transcripts containing exon 7 [50]. Singh and colleagues have described an ISS, called ISS-N1, located downstream of the 5' splice site in intron 7. They investigated the role of this element in exon 7 skipping with an antisense oligonucleotide targeting this sequence. They showed the restoration of exon 7 reinclusion and an increase of SMN protein in SMA patient-derived cells [51]. Subsequently, Hua et al. performed a large screening of both flanking introns using AOs that inhibit different ISS, discovering an optimal sequence that increased exon 7 inclusion in liver and kidney of human *SMN2* transgenic mice after systemic injection [52]. This sequence targeting the ISS-N1 has been studied further by several groups using different AO chemistry and reinclusion of exon 7 in SMN transcripts as well as an increase of the SMN protein could be shown in vitro and in vivo [53–59]. These promising results led to the recent clinical evaluation of this approach using a 2'-O-methoxyethyl (2'MOE) AO named nusinersen (marketed as Spinraza) in SMA patients. While treatment of SMA patients type 2 and 3 showed modest efficacy [59], results from a phase 3 trial in type I patients appear very encouraging with an improvement of motor skills [60]. Based on these data nusinersen was approved by the FDA in December 2016.

Although a mortality benefit seems likely the survival question remains, especially considering the mode of administration of nusinersen which has thus far been injected directly into the cerebrospinal fluid (CSF). This is of particular note since peripheral pathology has been demonstrated in SMA mice [61]. This indicates that peripheral SMN restoration is essential suggesting that combined central and peripheral delivery would be required for optimal treatment. Unfortunately most AOs injected intravenously cannot cross the blood-brain-barrier (except for the recently described tricyclo-DNA-AOs and some Peptide conjugated-PMO PPMOs [62,63], highlighting the need for viral vectors which offer a large panel of tropism depending on their serotypes (reviewed below in Section 4).

In order to investigate the vectorization and achieve long-term correction without AO accumulation in untargeted tissues, antisense sequences were introduced in the snRNA system. The first study using U7 snRNA targeting the intron 7/exon 8 junction of *SMN2* reported a considerable exon 7 re-inclusion and an increase of SMN protein in HeLa cells [64] and in SMA patient derived fibroblasts [65]. An Italian group developed several exon-specific U1 snRNAs (ExSpeU1) that correct aberrant splicing in coagulation factor IX, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) and *SMN2* [66]. After transduction of cells from SMA-affected patients with lentiviral particles expressing SMN-specific ExSpeU1, they demonstrated an augmentation of exon 7 inclusion leading to an increase of SMN protein. Most importantly they injected self-complementary AAV9 (scAAV9) carrying this therapeutic cassette intraperitoneally in transgenic mice at postnatal day 1, and showed the correction of the splicing defect in brain, heart, kidney, liver and skeletal muscle [67].

Schümperli and colleagues have developed bifunctional U7 snRNA based on bifunctional antisense oligonucleotide strategy. In addition to the antisense sequence these AOs carry either an SR peptide (containing repeats of serine and arginine residues, involved in splicing mechanism), or an ESE (exonic splicing enhancer) [68–70]. Both types of bifunctional AOs demonstrated an increase of SMN expression and a phenotype enhancement in mice model of SMA after intracerebroventricular injections [71–73]. Using the same principle bifunctional U7 snRNA carries an antisense sequence that binds to exon 7 and a free splicing enhancer sequence that promotes the inclusion of this exon. These constructs induce a nearly complete inclusion of exon 7 in *SMN2* transcripts and an extended increase of SMN protein level in HeLa cells and in SMA type I patient fibroblasts [74]. Subsequently they introduced this bifunctional U7 construct into the most severe SMA mouse model via transgenesis using lentivirus (LV) and observed a 20-fold increase in survival times (median of 123 days for U7-SMA mice compared to 6.5 days for SMA mice), normal weight development and muscle performance [75]. Interestingly, SMA mice expressing the therapeutic U7 cassette did not present ultrastructural changes in diaphragm neuromuscular junctions [76]. However, using this transgenic approach the study did not reveal if the phenotype could still be reverted when the therapy is administered after the first phases of post-natal life. This question was addressed in a recent study where they injected scAAV9 vector particles containing four copies of the U7 cassette into the cerebral ventricle of newborn SMA mice, and induced a significant increase in survival and muscle functions. Surprisingly the U7 snRNA was also expressed in heart and liver which was likely responsible for enhancing rescue of the phenotype [77]. All of these studies suggest that the correction of *SMN2* mRNA splicing and the alleviation of the phenotype not only work in a transgenic procedure but also in a somatic gene therapy approach.

- Pompe disease

Another example of exon inclusion worth mentioning is the approach applied to Pompe disease, (glycogen storage disease type II) which is an autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in the acid  $\alpha$ -glucosidase gene (*GAA*). Pompe disease leads to an accumulation of glycogen in the lysosome which damages muscle and nerve cells. The most common splice mutation is a T>G transition located in intron 1 which causes the skipping of exon 2, encompassing the start codon located within this exon. This mutation may modify the secondary structure of the pre-mRNA, altering the correct removal of intron 1. Our group has used AOs which simply bind to the 5' region of exon 2 in order to restore the secondary structure and allow normal splicing. The expression of a functional protein *GAA* has been rescued in skin fibroblasts derived from a Pompe patient with this mutation. Furthermore, we have shown inclusion of exon 2 at the *GAA* mRNA level after transduction with a lentiviral vector encoding an U7 snRNA targeting exon 2. In addition, the rescue of the *GAA* protein in treated cells has confirmed the potential of this U7 as a therapeutic tool for Pompe disease (Avril et al. manuscript in preparation).

### 3.1.3. Gene Knockdown

snRNA systems can also be used for exon-skipping to disrupt the open reading frame, thus creating a premature stop codon and preventing protein synthesis (Figure 2c). Schümperli's group first adapted this method as a potential therapy for human immunodeficiency virus (HIV) infection reducing the synthesis of cyclophilin A (CyPA) which is required for HIV multiplication. Two U7 snRNAs were engineered to target splice sites flanking exons 3 and 4 of CyPA and then transfected into HeLa cells. They showed that "double-target" constructs induce very efficient exon-skipping. The group then used lentiviral vectors to achieve stable cell transduction, demonstrating strong diminution of full length transcripts and CyPA protein in three different cell types [78]. Years later this approach was applied to Tat and Rev which are HIV regulatory proteins, confirming its use as a therapeutic tool for gene knockdown [79].

Apart from its use as a therapeutic tool the snRNA system may also be used to silence gene expression in order to further our understanding of encoded proteins. To learn about the function of Ca<sup>2+</sup> channel subunit called  $\alpha$ 1S, Garcia's group have engineered an U7 snRNA able to silence  $\alpha$ 1S expression disrupting the open reading frame by exon-skipping. This construct was cloned into an AAV vector then injected intramuscularly in mice, leading to long-lasting downregulation of  $\alpha$ 1S which was still reduced 6 months after injection [80]. This research allowed better understanding of the  $\alpha$ 1S subunit and highlighted the potential use of U7snRNA as a gene silencer, similar to the RNA interference technology.

### 3.2. Reduction of Toxicity Due to Triplet Expansion

The antisense approach has also been used to specifically target toxic transcripts containing abnormally high numbers of triplet repeats, as in the case of myotonic dystrophy. Myotonic dystrophy type I (DM1) is an autosomal dominant neuromuscular disease occurring due to the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region (3'UTR) of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) [81,82]. The mutant DMPK presents various lengths of CTG expansions ranging from 800 to 2000 repeats, whereas normal-sized alleles contain fewer than 37 repeats. Mutant transcripts are retained in the nucleus and form nuclear foci [83]. It has been shown that CUG repeats form RNA hairpins that bind different proteins such as muscleblind-like 1 (MBNL1) [84], which is a regulatory splicing factor. In fact, the sequestration of MBNL1 in the nucleus prevent its activity and trigger misregulation of alternative splicing of several genes, like CIC-1 which encodes for the main chloride channel in skeletal muscle [85–87]. Furling and colleagues have produced a retrovirus carrying antisense sequences complementary to CUG repeats and 110-bp region following the repeats to be specific of DMPK transcripts. They have shown a decrease of mutant DMPK transcripts after transduction of human DM1 myoblasts. Also the phenotype of these cells was restored after treatment, confirming the hypothesis that antisense will release MBNL1 previously sequestered by CUG hairpins [88].

Other studies have shown the therapeutic potential of AOs targeting the CUG repeats [89–92]. Using different AO chemical modifications and lengths, they all demonstrated silencing of mutant DMPK RNA expression and a normalizing effect on aberrant splicing in vitro and in vivo. Furling's group has also engineered a U7 snRNA targeting the CUG repeats and reported specific degradation of pathogenic DMPK mRNA after lentiviral transduction of myoblasts. Of interest, the number of foci was reduced and the splicing abnormalities were improved with the U7-(CAG)15 [93], implying the therapeutic potential of an snRNA based approach.

Altogether these approaches demonstrate the therapeutic potential of an snRNA based system, largely due to the properties of the viral vectors by which they are introduced.

#### 4. Advantages of Vectorized Systems

In order to play their therapeutic role antisense sequences must reach the nucleus, however, delivery of naked nucleic acids is a challenge given their extra-nuclear instability and poor cellular-uptake. The main advantage of the snRNA-based approach is that it may be vectorized in many different viruses, allowing better delivery of therapeutic sequences to target cells versus synthetic oligonucleotides for example. Viral vectors are considered as one of the most promising means of gene therapy delivery. During the last four decades, virus engineering techniques have been developed and upgraded in order to produce recombinant viruses. These modified viruses have no replicating or pathogenic characteristics but retain their ability to cross the cell and nuclear membranes. Modifications of the viral structure and choice of promoter allows greater specificity concerning the cell type or tissue targeted and the extent of gene expression.

When choosing a viral vector one must consider several parameters: The size of the construct, the nature and size of the tissue or organ targeted, the amount of gene expression needed to achieve therapeutic success and whether or not long-term gene expression is required to overcome the disease. The snRNA based approach was vectorized in several types of viral vectors and the advantages and disadvantages of each one will be discussed below.

##### 4.1. Retrovirus/Lentivirus

The snRNA based approach can be used as a therapeutic tool or more simply as a molecular tool when vectorized in retroviral or lentiviral vectors, depending on the required characteristics of these viruses and the disease to be targeted.

From the *Retroviridae* family, gammaretrovirus (MLV—murine leukemia viruses) and LVs are single stranded RNA viruses. Retroviral vectors were the most common gene transfer system used in gene therapy research until a trial for patients with X-linked severe combined immunodeficiency resulted in four out of nine treated patients developing leukaemia [94]. Retroviruses present two major safety issues: (I) the potential risk of insertional oncogenesis and (II) the possibility of generating replication competent retroviruses (RCR). Lentivirus' capacity to produce replication competent LVs (RCL) is much lower with current viral vector systems [95] and several generations of lentiviral vectors have been constructed to improve their safety and efficacy [96], but they still present a potential risk of insertional oncogenesis. These safety issues can be a major problem when considering in vivo treatments but the insertional capacity may be beneficial when specific and stable long-term expression of the transgene is needed to achieve therapeutic success. For these reasons this type of vector has mainly been used as a molecular tool for in vitro studies. For example, lentiviral vectors in combination with U7 snRNA system were used to show the proof of principle that the inclusion of *SMN2* exon 7 could reduce SMA symptoms [74,75]. Successful in vitro studies with using LV vectors were also conducted for DM1 [93], Central core disease [97], hematopoietic diseases [98] and acquired immune deficiency syndrome [78,79] suggesting a therapeutic potential of the LV-snRNA strategy for these particular diseases.

Even though safety issues limit the use of this type of vectors in clinical trials, they remain an excellent tool for diseases that can benefit from ex vivo treatments such as hematopoietic stem cell grafts or as a molecular tool to establish a proof-of-principle in vitro.

##### 4.2. Adenovirus

Few studies have used adenoviral vectors to vectorize U7 snRNAs. From the *Adenoviridae* family, adenoviruses are among the first studied viruses for use in gene therapy [99]. These are non-enveloped viruses with double stranded DNA genomes of about 26–45 kb in an icosahedral capsid. For use in gene therapy adenoviruses must be attenuated to avoid the dissemination of genetically modified vectors. The ability to delete the entirety of the adenovirus genome enables substantial coding capacity (up to 30 kb) [100]. More than 100 serotypes of adenoviral vectors have been reported, and serotypes 2



and 5 are often used for the advantage of being capable of transducing both dividing and non-dividing cells [101].

In SMA for example, one gene therapy study used adenoviral vectors of serotype 5 carrying the *SMN2*-antisense U7 snRNA to promote inclusion of *SMN2* intron 7 and successfully restored full-length *SMN* [65]. Among other advantages of adenoviral vectors, they are simple to purify and achieve high yields with. Furthermore, these vectors are non-integrative to the host genome conferring low genotoxicity. However, due to the high immunogenicity of the capsid adenoviral vectors are not the best candidates for systemic applications.

#### 4.3. Adeno-Associated Virus

Recombinant adeno-associated viruses (rAAV) are largely used for gene transfer in research, preclinical development and clinical trials and are considered today the best candidates for gene therapy strategies in neuromuscular diseases, due to several attractive characteristics discussed in this section. AAV from the *Parvoviridae* family are small non-enveloped viruses with single-stranded DNA. The size of AAV particles ranges between 25 and 30 nm and as such they have a low packaging capacity. The capsid is composed by three proteins: VP1, VP2 and VP3 (ratio 1:1:10) and modifications in VP proteins determine their different tissue tropism. These are non-integrative vectors, and therefore present a low risk of genomic insertions that might lead to tumourigenesis. They are able to efficiently transduce several tissue-types and display long-term efficacy in post-mitotic tissues which make them good candidates for numerous gene transfer applications. However, the number of AAV genomes in dividing cells decreases gradually [102] which renders AAV the best choice for the transduction of slowly dividing cells such as myocytes or cardiomyocytes. Clinical trials using rAAV as gene therapy vectors have yielded promising results and the first marketing approval, using a rAAV1 vector, was delivered by the European Union in October 2012 for the treatment of familial lipoprotein lipase deficiency [103].

One of the main advantages of AAV vectors is their effective delivery to various tissues following systemic injection, though this depends on the serotype used. For example, AAV1 is mainly used for its high efficacy in transducing skeletal muscle following IM injections when proof of principle is intended. Several studies have investigated the efficiency of modified U7 or U1 snRNA for DMD using the *mdx* and dKO model. As a proof of concept, U7 and U1snRNA were vectorised in an AAV1 to transduce local skeletal muscles. When IV administration is required to target all skeletal muscles AAV serotypes -6 and -9 are most suitable [104]. scAAV-9 was used in the dKO model not only because of its ability to transduce skeletal muscle, but cardiac muscle particularly efficiently [31]. Moreover the use of scAAV revealed an enhanced transduction capability when compared to conventional single-stranded AAV vectors (ssAAV), by circumventing the need to convert the single-stranded DNA genome into double-stranded DNA prior to expression [105].

Regarding delivery to the CNS several AAV serotypes are capable of transducing CNS cells when injected directly in the CSF (-1, -2, -4, -5, -7, -8, -9 and rh10), however only AAV serotypes -1, -8, -9 and rh10 have demonstrated the ability to transduce CNS cells following IV injections [106,107].

These properties are particularly useful for the treatment of diseases like SMA where both the peripheral and central nervous systems require targeting. Comparison between AAV1 and scAAV9 revealed a greater transduction potential of the later to transduce motor neurons following IV injections [108]. This finding was confirmed in neonatal [108–110] and adult mice [108,111], as well as cats [108] and non-human primates [111,112]. Further comparison of AAV9 and AAVrh10 revealed that despite both serotypes being able to transduce CNS cells, at lower doses AAVrh10 is superior especially in the brainstem and cerebellum, which are important targets for the treatment of SMA type 1 [106].

A major disadvantage of AAV vectors for their use in gene therapy is their low packaging capacity, though this is not an issue for a snRNA-based approach given the small cassette size. This represents one of the main advantages of this strategy, since several snRNA cassettes may be inserted into a

single AAV in order to induce double-skipping or even multi-skipping. One study reported the efficacy of eleven U7 snRNA constructs in AAV1 and a combination of at least 3 constructs in a single vector [39]. In fact, multi-skipping was also demonstrated in the GRMD model for which the skipping of at least two exons is required to restore the reading frame. Studies demonstrated efficient dystrophin rescue and muscle function improvement: following IM injection and forelimb perfusion of AAV1 [36]; percutaneous transendocardial delivery of recombinant AAV6 [35]; and AAV8 injected by locoregional transvenous perfusion of the forelimb [37]. Altogether these studies highlight the advantage of an AAV-snRNA based approach, however a 5-year follow-up study in the GRMD model revealed the progressive loss of both AAV vectors and the number of corrected muscle fibers. This effect might be due to the persistence of the dystrophic process, similar to BMD phenotypes [36]. This important finding also reported in the dKO mouse model suggests a need for repeated administration of AAV [102]. Unfortunately, the production of neutralizing antibodies following the first injection of AAV prohibits repeated injections of this type of vector, which currently represents the main challenge to the clinical application of this approach.

AAV vectors display significant advantages over other types of viral vectors: they are well tolerated after *in vivo* delivery; present broad *in vivo* biodistribution; lower capsid immunogenicity when compared to adenoviral vectors; and the availability of numerous serotypes with different tissue tropisms [113] is advantageous in treating multiple pathologies. In addition AAV-purification methods are evolving, resulting in higher yields and better transduction capacity [114]. One of the famously known limitations of AAV vectors is their low packaging capacity, however as already mentioned this is not an issue with the snRNA system given the small size of the cassette. As discussed one can even insert multiple snRNA cassettes in one vector, thereby enlarging the potential targets for example several exons or even several genes.

## 5. Conclusions

Advances in the field of genetic research led to the discovery of an increasing number of diseases found to be caused by alternative or aberrant splicing that could benefit from antisense therapy. Treatments with synthetic antisense oligonucleotides presents several challenges including low cellular uptake, low specificity when targeting specific tissues and rapid elimination from the circulation. To overcome these challenges, the vectorisation of antisense sequences using snRNA systems in viral vectors brings new possibilities. The option of using snRNAs offers many advantages amongst which specific subcellular localization and possible long-term correction, as well as limiting the potential toxicity induced by life-long administration of AOs. Moreover, since snRNAs act on the natural RNA of the targeted gene, the effects are time- and tissue-specific, avoiding any ectopic expression of the 'corrected' gene, as opposed to classical gene therapy approaches that use strong promoters. The ability to clone several cassettes in the same vector offers the possibility of targeting several exons or even several genes at the same time. In summary despite the immunological barriers faced by the viral vectors in the environments to which they are introduced, the viral vector-snRNA-mediated antisense approach represents a very promising tool for the treatment of genetic diseases.

**Acknowledgments:** The authors have financial support from the Agence Nationale de la Recherche (ANR—Chair of Excellence HandiMedEx), the Association Monegasque contre les Myopathies (AMM), the Duchenne Parent Project France (DPPF) and the Association Française contre les Myopathies (AFM).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

2'OMe	2'-O-methyl
2'MOE	2'-O-methoxyethyl
AAV	Adeno-associated virus

AO	Antisense oligonucleotide
BMD	Becker muscular dystrophy
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CyPA	Cyclophilin A
dKO	Double knock out
DM1	Myotonic dystrophy type 1
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DMPK	Dystrophia myotonica protein kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FDA	Food and drug administration
GAA	Acid $\alpha$ -glucosidase
GFP	Green fluorescent protein
GRMD	Golden retriever muscular dystrophy
HD	Huntington's disease
HDE	Histone downstream element
hDMD	Human DMD
HIV	Human immunodeficiency virus type 1
hnRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
IM	Intramuscular
ISE	Intronic splicing enhancers
ISS	Intronic splicing silencers
IV	Intravenous
LNA	Locked nucleic acid
LV	Lentivirus
MBNL1	Muscleblind-like protein 1
MLV	Murine leukemia viruses
PMO	Phosphorodiamidate morpholino oligomers
PNA	Peptide nucleic acid
PPMO	Peptide phosphorodiamidate morpholino oligomers
rAAV	Recombinant Adeno-associated virus
RCL	replication competent lentiviruses
RCR	replication competent retroviruses
RNA	Ribonucleic acid
RYR1	Type 1 ryanodine receptor
scAAV	Self-complementary adeno-associated virus
SMA	Spinal muscular atrophy
snRNA	Small nuclear RNA
snRNP	Small nuclear ribonucleoproteins
SR protein	Serine/arginine-rich protein
UTR	Untranslated transcribed region
VP	Viral protein

## References

1. Stephenson, M.L.; Zamecnik, P.C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 285–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schümperli, D.; Pillai, R.S. The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2560–2570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Grimm, C.; Stefanovic, B.; Schümperli, D. The low abundance of U7 snRNA is partly determined by its Sm binding site. *EMBO J.* **1993**, *12*, 1229–1238. [[PubMed](#)]

4. Stefanovic, B.; Hackl, W.; Lührmann, R.; Schümperli, D. Assembly, nuclear import and function of U7 snRNPs studied by microinjection of synthetic U7 RNA into *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3141–3151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gorman, L.; Mercatante, D.R.; Kole, R. Restoration of Correct Splicing of Thalassemic -Globin Pre-mRNA by Modified U1 snRNAs. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35914–35919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Noonberg, S.B.; Scott, G.K.; Garovoy, M.R.; Benz, C.C.; Hunt, C.A. In vivo generation of highly abundant sequence-specific oligonucleotides for antisense and triplex gene regulation. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2830–2836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Good, P.D.; Krikos, A.J.; Li, S.X.L.; Bertrand, E.; Lee, N.S.; Giver, L.; Ellington, A.; Zaia, J.A.; Rossi, J.J.; Engelke, D.R. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wahl, M.C.; Will, C.L.; Lührmann, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* **2009**, *136*, 701–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gorman, L.; Suter, D.; Emerick, V.; Schümperli, D.; Kole, R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4929–4934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M.; Scherpf, S.; Heindrich, K.; Bettecken, T.; Meng, G.; Müller, C.R.; Lindlöf, M.; Kaariainen, H.; et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**, *45*, 498. [[PubMed](#)]
11. Pramono, Z.A.D.; Takeshima, Y.; Alimsardjono, H.; Ishii, A.; Takeda, S.; Matsuo, M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 445–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dunckley, M.G.; Manoharan, M.; Villiet, P.; Eperon, I.C.; Dickson, G. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured *Mdx* muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *5*, 1083–1090. [[CrossRef](#)]
13. Mann, C.J.; Honeyman, K.; Cheng, A.J.; Ly, T.; Lloyd, F.; Fletcher, S.; Morgan, J.E.; Partridge, T.A.; Wilton, S.D. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the *mdx* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 42–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Van Deutekom, J.C.; Janson, A.A.; Ginjaar, I.B.; Frankhuizen, W.S.; Aartsma-Rus, A.; Bremmer-Bout, M.; den Dunnen, J.T.; Koop, K.; van der Kooi, A.J.; Goemans, N.M.; et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 2677–2686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Goemans, N.M.; Tulinius, M.; van den Akker, J.T.; Burm, B.E.; Ekhart, P.F.; Heuvelmans, N.; Holling, T.; Janson, A.A.; Platenburg, G.J.; Sipkens, J.A.; et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1513–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Voit, T.; Topaloglu, H.; Straub, V.; Muntoni, F.; Deconinck, N.; Campion, G.; De Kimpe, S.J.; Eagle, M.; Guglieri, M.; Hood, S.; et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 987–996. [[CrossRef](#)]
17. Flanigan, K.M.; Voit, T.; Rosales, X.Q.; Servais, L.; Kraus, J.E.; Wardell, C.; Morgan, A.; Dorricott, S.; Nakielny, J.; Quarcoo, N.; et al. Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: Results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul. Disord. NMD* **2014**, *24*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Goemans, N.M.; Tulinius, M.; van den Hauwe, M.; Kroksmark, A.-K.; Buyse, G.; Wilson, R.J.; van Deutekom, J.C.; de Kimpe, S.J.; Loubakos, A.; Campion, G. Long-Term Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Drisapersen in Duchenne Muscular Dystrophy: Results from an Open-Label Extension Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Shimizu-Motohashi, Y.; Miyatake, S.; Komaki, H.; Takeda, S.; Aoki, Y. Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: from discovery to clinical trials. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 2471. [[PubMed](#)]
20. Cirak, S.; Feng, L.; Anthony, K.; Arechavala-Gomez, V.; Torelli, S.; Sewry, C.; Morgan, J.E.; Muntoni, F. Restoration of the Dystrophin-associated Glycoprotein Complex After Exon Skipping Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 462–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Cirak, S.; Arechavala-Gomez, V.; Guglieri, M.; Feng, L.; Torelli, S.; Anthony, K.; Abbs, S.; Garralda, M.E.; Bourke, J.; Wells, D.J.; et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* **2011**, *378*, 595–605. [[CrossRef](#)]
22. Mendell, J.R.; Rodino-Klapac, L.R.; Sahenk, Z.; Roush, K.; Bird, L.; Lowes, L.P.; Alfano, L.; Gomez, A.M.; Lewis, S.; Kota, J.; et al. Eteplirsen Study Group Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Eteplirsen for DMD. *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 637–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mendell, J.R.; Goemans, N.; Lowes, L.P.; Alfano, L.N.; Berry, K.; Shao, J.; Kaye, E.M.; Mercuri, E. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **2016**, *79*, 257–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. Immunological and hematological toxicities challenging clinical translation of nucleic acid-based therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1023–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Neri, M.; Torelli, S.; Brown, S.; Ugo, I.; Sabatelli, P.; Merlini, L.; Spitali, P.; Rimessi, P.; Gualandi, F.; Sewry, C.; et al. Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromuscul. Disord.* **2007**, *17*, 913–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sharp, P.S.; Bye-a-Jee, H.; Wells, D.J. Physiological Characterization of Muscle Strength With Variable Levels of Dystrophin Restoration in *mdx* Mice Following Local Antisense Therapy. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 165–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Godfrey, C.; Muses, S.; McClorey, G.; Wells, K.E.; Coursindel, T.; Terry, R.L.; Betts, C.; Hammond, S.; O'Donovan, L.; Hildyard, J.; et al. How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the *mdx* mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 4225–4237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. De Angelis, F.G.; Sthandier, O.; Berarducci, B.; Toso, S.; Galluzzi, G.; Ricci, E.; Cossu, G.; Bozzoni, I. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in  $\Delta 48-50$  DMD cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9456–9461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Brun, C.; Suter, D.; Pauli, C.; Dunant, P.; Lochmüller, H.; Burgunder, J.M.; Schümperli, D.; Weis, J. U7 snRNAs induce correction of mutated dystrophin pre-mRNA by exon skipping. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2003**, *60*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Goyenvalle, A.; Vulin, A.; Fougereousse, F.; Leturcq, F.; Kaplan, J.-C.; Garcia, L.; Danos, O. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* **2004**, *306*, 1796–1799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Goyenvalle, A.; Babbs, A.; Wright, J.; Wilkins, V.; Powell, D.; Garcia, L.; Davies, K.E. Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 2559–2571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Denti, M.A.; Rosa, A.; D'Antona, G.; Sthandier, O.; Angelis, F.G.D.; Nicoletti, C.; Allocca, M.; Pansarasa, O.; Parente, V.; Musarò, A.; et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of *mdx* mice. *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 565–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Denti, M.A.; Rosa, A.; D'Antona, G.; Sthandier, O.; De Angelis, F.G.; Nicoletti, C.; Allocca, M.; Pansarasa, O.; Parente, V.; Musarò, A.; et al. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the *mdx* mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3758–3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Denti, M.A.; Incitti, T.; Sthandier, O.; Nicoletti, C.; Angelis, F.G.D.; Rizzuto, E.; Auricchio, A.; Musarò, A.; Bozzoni, I. Long-Term Benefit of Adeno-Associated Virus/Antisense-Mediated Exon Skipping in Dystrophic Mice. *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 601–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bish, L.T.; Sleeper, M.M.; Forbes, S.C.; Wang, B.; Reynolds, C.; Singletary, G.E.; Trafny, D.; Morine, K.J.; Sanmiguel, J.; Cecchini, S.; et al. Long-term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-mediated Exon Skipping. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 580–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Vulin, A.; Barthélémy, L.; Goyenvalle, A.; Thibaud, J.-L.; Beley, C.; Griffith, G.; Benchaouir, R.; le Hir, M.; Unterfinger, Y.; Lorain, S.; et al. Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 2120–2133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Le Guiner, C.; Montus, M.; Servais, L.; Chereil, Y.; Francois, V.; Thibaud, J.-L.; Wary, C.; Matot, B.; Larcher, T.; Guigand, L.; et al. Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2014**, *22*, 1923–1935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Incitti, T.; De Angelis, F.G.; Cazzella, V.; Sthandier, O.; Pinnarò, C.; Legnini, I.; Bozzoni, I. Exon Skipping and Duchenne Muscular Dystrophy Therapy: Selection of the Most Active U1 snRNA Antisense Able to Induce Dystrophin Exon 51 Skipping. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1675–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Goyenvalle, A.; Wright, J.; Babbs, A.; Wilkins, V.; Garcia, L.; Davies, K.E. Engineering Multiple U7snRNA Constructs to Induce Single and Multiexon-skipping for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1212–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Goyenvalle, A.; Babbs, A.; van Ommen, G.-J.B.; Garcia, L.; Davies, K.E. Enhanced Exon-skipping Induced by U7 snRNA Carrying a Splicing Silencer Sequence: Promising Tool for DMD Therapy. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1234–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sinnreich, M.; Therrien, C.; Karpati, G. Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* **2006**, *66*, 1114–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wein, N.; Avril, A.; Bartoli, M.; Beley, C.; Chaouch, S.; Laforêt, P.; Behin, A.; Butler-Browne, G.; Mouly, V.; Krahn, M.; et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 136–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lefebvre, S.; Bürglen, L.; Reboullet, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet, L.; Benichou, B.; Cruaud, C.; Millasseau, P.; Zeviani, M.; et al. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell* **1995**, *80*, 155–165. [[CrossRef](#)]
44. Lorson, C.L.; Hahnen, E.; Androphy, E.J.; Wirth, B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6307–6311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Monani, U.R.; Lorson, C.L.; Parsons, D.W.; Prior, T.W.; Androphy, E.J.; Burghes, A.H.; McPherson, J.D. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 1177–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Feldkötter, M.; Schwarzer, V.; Wirth, R.; Wienker, T.F.; Wirth, B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 358–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cartegni, L.; Hastings, M.L.; Calarco, J.A.; de Stanchina, E.; Krainer, A.R. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *78*, 63–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lorson, C.L.; Androphy, E.J. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Gladman, J.T.; Chandler, D.S. Intron 7 conserved sequence elements regulate the splicing of the SMN genes. *Hum. Genet.* **2009**, *126*, 833–841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lim, S.R. Modulation of Survival Motor Neuron Pre-mRNA Splicing by Inhibition of Alternative 3' Splice Site Pairing. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45476–45483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Singh, N.K.; Singh, N.N.; Androphy, E.J.; Singh, R.N. Splicing of a Critical Exon of Human Survival Motor Neuron Is Regulated by a Unique Silencer Element Located in the Last Intron. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1333–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hua, Y.; Vickers, T.A.; Okunola, H.L.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Antisense Masking of an hnRNP A1/A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 834–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hua, Y.; Sahashi, K.; Hung, G.; Rigo, F.; Passini, M.A.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1634–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hua, Y.; Sahashi, K.; Rigo, F.; Hung, G.; Horev, G.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* **2011**, *478*, 123–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Passini, M.A.; Bu, J.; Richards, A.M.; Kinnecom, C.; Sardi, S.P.; Stanek, L.M.; Hua, Y.; Rigo, F.; Matson, J.; Hung, G.; et al. Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 72ra18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Porensky, P.N.; Mitrpant, C.; McGovern, V.L.; Bevan, A.K.; Foust, K.D.; Kaspar, B.K.; Wilton, S.D.; Burghes, A.H.M. A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1625–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Rigo, F.; Chun, S.J.; Norris, D.A.; Hung, G.; Lee, S.; Matson, J.; Fey, R.A.; Gaus, H.; Hua, Y.; Grundy, J.S.; et al. Pharmacology of a Central Nervous System Delivered 2'-O-Methoxyethyl-Modified Survival of Motor Neuron Splicing Oligonucleotide in Mice and Nonhuman Primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *350*, 46–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhou, H.; Janghra, N.; Mitrpant, C.; Dickinson, R.L.; Anthony, K.; Price, L.; Eperon, I.C.; Wilton, S.D.; Morgan, J.; Muntoni, F. A Novel Morpholino Oligomer Targeting ISS-N1 Improves Rescue of Severe Spinal Muscular Atrophy Transgenic Mice. *Hum. Gene Ther.* **2013**, *24*, 331–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Chiriboga, C.A.; Swoboda, K.J.; Darras, B.T.; Iannaccone, S.T.; Montes, J.; De Vivo, D.C.; Norris, D.A.; Bennett, C.F.; Bishop, K.M. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN Rx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* **2016**, *86*, 890–897.
60. Garber, K. Big win possible for Ionis/Biogen antisense drug in muscular atrophy. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 1002–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Hua, Y.; Liu, Y.H.; Sahashi, K.; Rigo, F.; Bennett, C.F.; Krainer, A.R. Motor neuron cell-nonautonomous rescue of spinal muscular atrophy phenotypes in mild and severe transgenic mouse models. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 288–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hammond, S.M.; Hazell, G.; Shabanpoor, F.; Saleh, A.F.; Bowerman, M.; Sleight, J.N.; Meijboom, K.E.; Zhou, H.; Muntoni, F.; Talbot, K.; et al. Systemic peptide-mediated oligonucleotide therapy improves long-term survival in spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 10962–10967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Goyenvalle, A.; Griffith, G.; Babbs, A.; Andaloussi, S.E.; Ezzat, K.; Avril, A.; Dugovic, B.; Chaussenot, R.; Ferry, A.; Voit, T.; et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 270–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Madocsai, C.; Lim, S.; Geib, T.; Lam, B.; Hertel, K. Correction of Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1013–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Geib, T.; Hertel, K.J. Restoration of Full-Length SMN Promoted by Adenoviral Vectors Expressing RNA Antisense Oligonucleotides Embedded in U7 snRNAs. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Fernandez Alanis, E.; Pinotti, M.; Dal Mas, A.; Balestra, D.; Cavallari, N.; Rogalska, M.E.; Bernardi, F.; Pagni, F. An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 2389–2398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Dal Mas, A.; Rogalska, M.E.; Bussani, E.; Pagni, F. Improvement of SMN2 Pre-mRNA Processing Mediated by Exon-Specific U1 Small Nuclear RNA. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *96*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Skordis, L.A.; Duncley, M.G.; Yue, B.; Eperon, I.C.; Muntoni, F. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4114–4119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Cartegni, L.; Krainer, A.R. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 120–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Dickson, A.; Osman, E.; Lorson, C.L. A Negatively Acting Bifunctional RNA Increases Survival Motor Neuron Both In Vitro and In Vivo. *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 1307–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Baughan, T.D.; Dickson, A.; Osman, E.Y.; Lorson, C.L. Delivery of bifunctional RNAs that target an intronic repressor and increase SMN levels in an animal model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 1600–1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Osman, E.Y.; Yen, P.-F.; Lorson, C.L. Bifunctional RNAs Targeting the Intronic Splicing Silencer N1 Increase SMN Levels and Reduce Disease Severity in an Animal Model of Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 119–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Owen, N.; Zhou, H.; Malygin, A.A.; Sangha, J.; Smith, L.D.; Muntoni, F.; Eperon, I.C. Design principles for bifunctional targeted oligonucleotide enhancers of splicing. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7194–7208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Marquis, J.; Meyer, K.; Angehrn, L.; Kämpfer, S.S.; Rothen-Rutishauser, B.; Schümperli, D. Spinal Muscular Atrophy: SMN2 Pre-mRNA Splicing Corrected by a U7 snRNA Derivative Carrying a Splicing Enhancer Sequence. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1479–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Meyer, K.; Marquis, J.; Trub, J.; Nlend Nlend, R.; Verp, S.; Ruepp, M.-D.; Imboden, H.; Barde, I.; Trono, D.; Schümperli, D. Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *18*, 546–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Voigt, T.; Meyer, K.; Baum, O.; Schümperli, D. Ultrastructural changes in diaphragm neuromuscular junctions in a severe mouse model for Spinal Muscular Atrophy and their prevention by bifunctional U7 snRNA correcting SMN2 splicing. *Neuromuscul. Disord.* **2010**, *20*, 744–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Odermatt, P.; Trüb, J.; Furrer, L.; Fricker, R.; Marti, A.; Schümperli, D. Somatic Therapy of a Mouse SMA Model with a U7 snRNA Gene Correcting SMN2 Splicing. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 1797–1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Liu, S.; Asparuhova, M.; Brondani, V.; Ziekau, I.; Klimkait, T.; Schümperli, D. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3752–3759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Asparuhova, M.B.; Marti, G.; Liu, S.; Serhan, F.; Trono, D.; Schümperli, D. Inhibition of HIV-1 multiplication by a modified U7 snRNA inducing Tat and Rev exon skipping. *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 323–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Piétri-Rouxel, F.; Gentil, C.; Vassilopoulos, S.; Baas, D.; Mouisel, E.; Ferry, A.; Vignaud, A.; Houndé, C.; Marty, I.; Schaeffer, L.; et al. DHPR  $\alpha$ 1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J.* **2010**, *29*, 643–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Brook, J.D.; McCurrach, M.E.; Harley, H.G.; Buckler, A.J.; Church, D.; Aburatani, H.; Hunter, K.; Stanton, V.P.; Thirion, J.P.; Hudson, T. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **1992**, *68*, 799–808. [[CrossRef](#)]
82. Mahadevan, M.; Tsilfidis, C.; Sabourin, L.; Shutler, G.; Amemiya, C.; Jansen, G.; Neville, C.; Narang, M.; Barceló, J.; O'Hoy, K. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **1992**, *255*, 1253–1255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Davis, B.M.; McCurrach, M.E.; Taneja, K.L.; Singer, R.H.; Housman, D.E. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7388–7393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Miller, J.W. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG) $_n$  expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* **2000**, *19*, 4439–4448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Charlet-B, N.; Savkur, R.S.; Singh, G.; Phillips, A.V.; Grice, E.A.; Cooper, T.A. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 45–53. [[CrossRef](#)]
86. Mankodi, A.; Takahashi, M.P.; Jiang, H.; Beck, C.L.; Bowers, W.J.; Moxley, R.T.; Cannon, S.C.; Thornton, C.A. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 35–44. [[CrossRef](#)]
87. Jiang, H. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 3079–3088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Furling, D.; Doucet, G.; Langlois, M.-A.; Timchenko, L.; Belanger, E.; Cossette, L.; Puymirat, J. Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 795–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Wheeler, T.M.; Sobczak, K.; Lueck, J.D.; Osborne, R.J.; Lin, X.; Dirksen, R.T.; Thornton, C.A. Reversal of RNA Dominance by Displacement of Protein Sequestered on Triplet Repeat RNA. *Science* **2009**, *325*, 336–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Wheeler, T.M.; Leger, A.J.; Pandey, S.K.; MacLeod, A.R.; Nakamori, M.; Cheng, S.H.; Wentworth, B.M.; Bennett, C.F.; Thornton, C.A. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* **2012**, *488*, 111–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Wojtkowiak-Szlachcic, A.; Taylor, K.; Stepniak-Konieczna, E.; Sznajder, L.J.; Mykowska, A.; Sroka, J.; Thornton, C.A.; Sobczak, K. Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 3318–3331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



92. Mulders, S.A.; van den Broek, W.J.; Wheeler, T.M.; Croes, H.J.; van Kuik-Romeijn, P.; de Kimpe, S.J.; Furling, D.; Platenburg, G.J.; Gourdon, G.; Thornton, C.A.; et al. Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13915–13920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. François, V.; Klein, A.F.; Beley, C.; Jollet, A.; Lemercier, C.; Garcia, L.; Furling, D. Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 85–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.L.; et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **2000**, *288*, 669–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cornetta, K.; Yao, J.; Jasti, A.; Koop, S.; Douglas, M.; Hsu, D.; Couture, L.A.; Hawkins, T.; Duffy, L. Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2011**, *19*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Kumar, P.; Woon-Khiong, C. Optimization of lentiviral vectors generation for biomedical and clinical research purposes: contemporary trends in technology development and applications. *Curr. Gene Ther.* **2011**, *11*, 144–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Rendu, J.; Brocard, J.; Denarier, E.; Monnier, N.; Piétri-Rouxel, F.; Beley, C.; Roux-Buisson, N.; Gilbert-Dussardier, B.; Perez, M.J.; Romero, N.; et al. Exon skipping as a therapeutic strategy applied to an *RYR1* mutation with pseudo-exon inclusion causing a severe core myopathy. *Hum. Gene Ther.* **2013**, *24*, 702–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Vacek, M.M.; Ma, H.; Gemignani, F.; Lacerra, G.; Kafri, T.; Kole, R. High-level expression of hemoglobin A in human thalassemic erythroid progenitor cells following lentiviral vector delivery of an antisense snRNA. *Blood* **2003**, *101*, 104–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Quantin, B.; Perricaudet, L.D.; Tajbakhsh, S.; Mandel, J.L. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2581–2584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Giacca, M.; Zacchigna, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 377–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Thrasher, A.J.; Gaspar, H.B.; Baum, C.; Modlich, U.; Schambach, A.; Candotti, F.; Otsu, M.; Sorrentino, B.; Scobie, L.; Cameron, E.; et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature* **2006**, *443*, E5–E7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Le Hir, M.; Goyenvalle, A.; Peccate, C.; Précigout, G.; Davies, K.E.; Voit, T.; Garcia, L.; Lorain, S. AAV Genome Loss From Dystrophic Mouse Muscles During AAV-U7 snRNA-mediated Exon-skipping Therapy. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1551–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Gaudet, D.; Méthot, J.; Déry, S.; Brisson, D.; Essiembre, C.; Tremblay, G.; Tremblay, K.; de Wal, J.; Twisk, J.; van den Bulk, N.; et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.* **2013**, *20*, 361–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Nonnenmacher, M.; Weber, T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* **2012**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. McCarty, D.M.; Monahan, P.E.; Samulski, R.J. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1248–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Tanguy, Y.; Biferi, M.G.; Besse, A.; Astord, S.; Cohen-Tannoudji, M.; Marais, T.; Barkats, M. Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front. Mol. Neurosci.* **2015**, *8*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Miyake, N.; Miyake, K.; Yamamoto, M.; Hirai, Y.; Shimada, T. Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Res.* **2011**, *1389*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Duque, S.; Joussemet, B.; Riviere, C.; Marais, T.; Dubreil, L.; Douar, A.-M.; Fyfe, J.; Moullier, P.; Colle, M.-A.; Barkats, M. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2009**, *17*, 1187–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Benkhelifa-Ziyyat, S.; Besse, A.; Roda, M.; Duque, S.; Astord, S.; Carcenac, R.; Marais, T.; Barkats, M. Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2013**, *21*, 282–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Foust, K.D.; Nurre, E.; Montgomery, C.L.; Hernandez, A.; Chan, C.M.; Kaspar, B.K. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Gray, S.J.; Matagne, V.; Bachaboina, L.; Yadav, S.; Ojeda, S.R.; Samulski, R.J. Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1058–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Bevan, A.K.; Duque, S.; Foust, K.D.; Morales, P.R.; Braun, L.; Schmelzer, L.; Chan, C.M.; McCrate, M.; Chicoine, L.G.; Coley, B.D.; et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2011**, *19*, 1971–1980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Balakrishnan, B.; Jayandharan, G.R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2014**, *14*, 86–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Dias Florencio, G.; Precigout, G.; Beley, C.; Buclez, P.-O.; Garcia, L.; Benchaouir, R. Simple downstream process based on detergent treatment improves yield and in vivo transduction efficacy of adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2015**, *2*, 15024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### III. Résumé soumis à la 12<sup>ème</sup> conférence CHDI – Malte

#### Article en cours d'écriture

## Therapeutic strategy for Huntington's disease based on antisense oligonucleotide

Marine Imbert<sup>1</sup>, Florence Blandel<sup>1</sup>, Marc Fournet<sup>1</sup>, Christian Leumann<sup>2</sup>, Luis Garcia<sup>1</sup> and Aurélie Goyenvalle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Université de Versailles St-Quentin, INSERM U1179, UFR des Sciences de la Santé, France.*

<sup>2</sup> *Departments of Chemistry & Biochemistry, University of Bern, Switzerland*

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by a CAG repeat expansion in the first exon of huntingtin gene (*HTT*) encoding for a toxic polyglutamine protein. This disease is characterized by motor, psychiatric and cognitive impairments. Currently, there is no treatment. However, reducing the expression of the huntingtin protein using antisense oligonucleotide (AON) has been shown as a promising therapeutic strategy. In this project, I explore the therapeutic potential of AON made of tricyclo-DNA (TcDNA), a novel conformationally constrained DNA analog, to *silence* *HTT*.

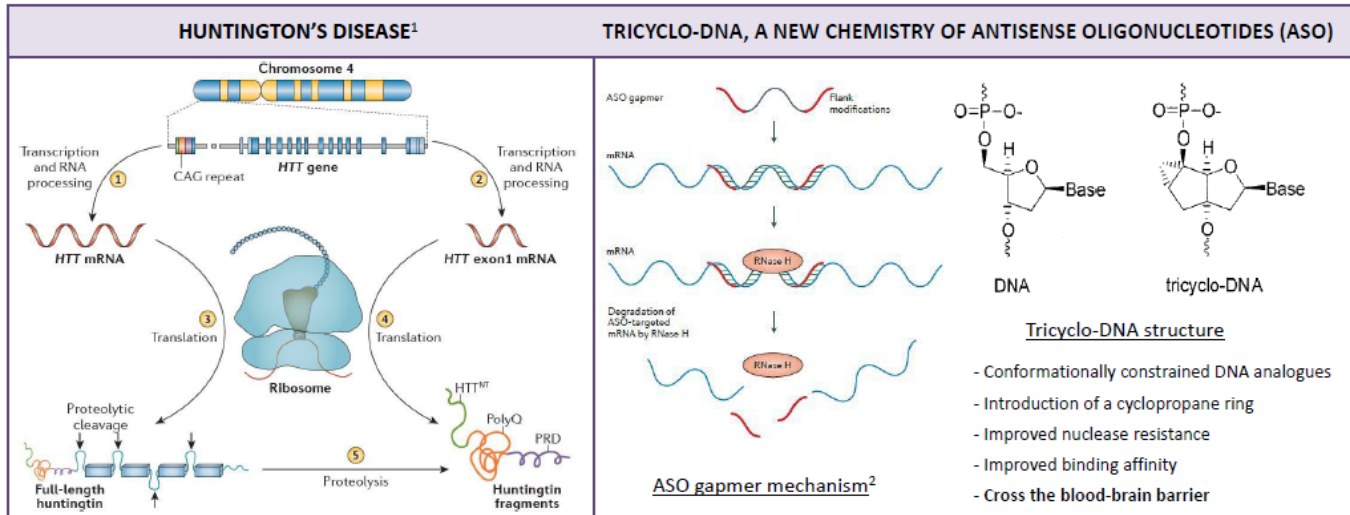
We designed a *gapmer* AON, containing central DNA nucleotides flanked by TcDNA modifications on 5' and 3' ends. This TcDNA-AON targets the exon 36 of *HTT* mRNA, creating a DNA/RNA complex allowing the RNase H recruitment and subsequent degradation of the messenger.

After transfection of TcDNA-AON in patient-derived fibroblast cell lines, we show a strong decrease of *HTT* mRNA and protein levels. As a control, 2'O-Methyl-RNA-AON targeting the same region of *HTT* was also tested and did not induced significant effect. TcDNA-AON was then evaluated *in vivo* in a HD mice model, the YAC128, containing the full-length human *HTT* gene with 128 CAG repeat expansion. Intracerebroventricular (ICV) injections were performed with 130 and 260 µg of TcDNA-AON and a significant decrease of *HTT* messenger and protein levels were observed 2 weeks after treatment in cortex, hippocampus and striatum. We are currently evaluating longer time points as well as TcDNA biodistribution to characterize the persistence of TcDNA-AON after a single injection and its effect in the various compartments of the CNS. In summary, TcDNA *gapmer* induces encouraging reduction of *HTT* mRNA and huntingtin *in vitro* and *in vivo*. Therefore, TcDNA represents a promising alternative AON therapeutic tool for HD patients.

Marine Imbert<sup>1</sup>, Florence Blandel<sup>1</sup>, Marc Fournet<sup>1</sup>, Christian Leumann<sup>2</sup>, Luis Garcia<sup>1</sup> and Aurélie Goyenvalle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Versailles St-Quentin, INSERM U1179, UFR des Sciences de la Santé, France.

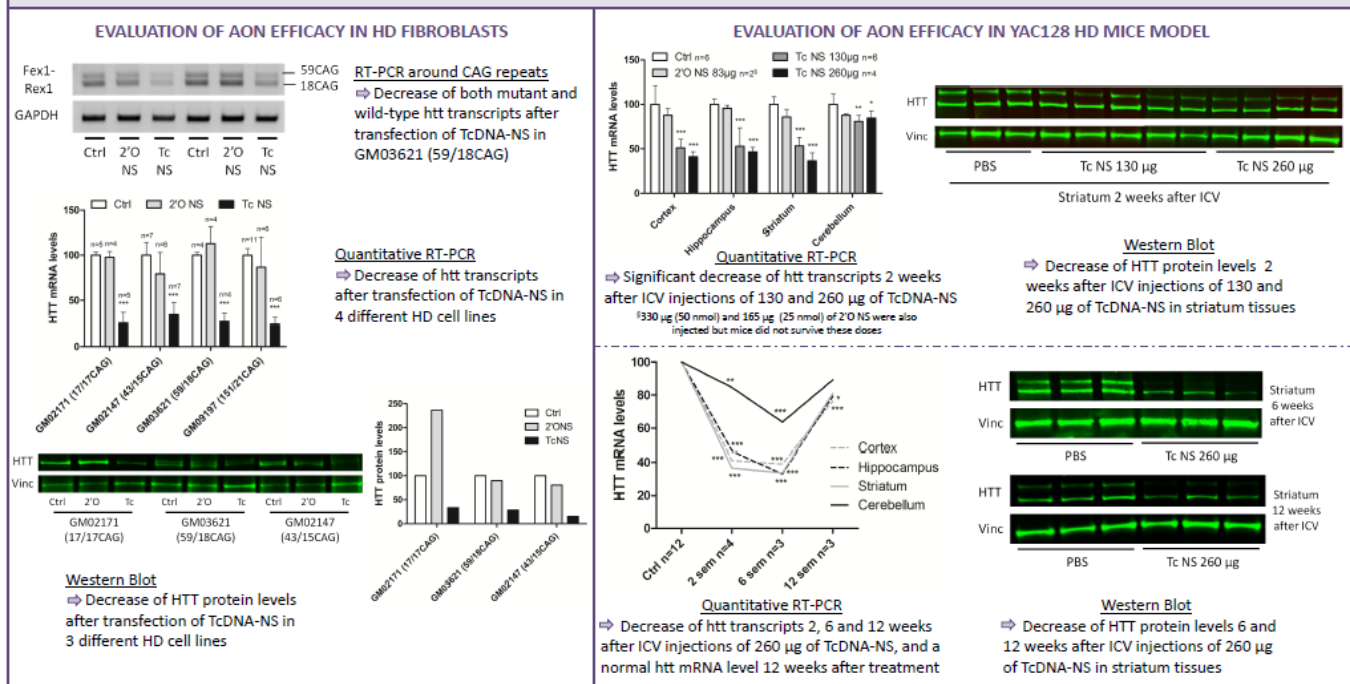
<sup>2</sup> Departments of Chemistry & Biochemistry, University of Bern, Switzerland



**MATERIALS AND METHODS**

GAPMER ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES	IN VITRO MODELS	IN VIVO MODEL
Target the exon 36 of <i>htt</i> mRNA <sup>3</sup> to induce silencing of mutant and wild-type <i>htt</i> transcripts (non-specific mutant allele: NS) 2'O-Methyl-RNA ⇒ 2'O NS Tricyclo-DNA ⇒ Tc NS	Patient-derived fibroblast cell lines with different CAG repeats number - GM02171 (17/17CAG) - GM03621 (59/18CAG) - GM02147 (43/15CAG) - GM09197 (151/21CAG)	HD mice model: YAC128, containing the full-length human <i>htt</i> gene with 128 CAG repeat expansion ⇒ Intracerebroventricular (ICV) injections of AON

**REPRESSION OF HUNTINGTIN SYNTHESIS USING TRICYCLO-DNA**



**CONCLUSION AND PROSPECTS**

In this proof of concept study, we have demonstrated the ability of TcDNA to significantly decrease *htt* at mRNA and protein levels *in vitro* and *in vivo*. TcDNA did not induce toxicity issues as observed with 2'Ome (which imposed low dose only). Therefore, TcDNA represents a promising alternative AON therapeutic tool for HD patients especially considering their ability to cross the blood brain barrier when administered systemically<sup>4,5</sup>, which could ameliorate the peripheral issues associated with HD. This work focused on the non allele specific approach as a proof of principle, but other strategies (allele specific and exon skipping) using TcDNA are currently under evaluation.

1. Bates, G.P., Dorsey, R., Gueula, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scullin, R.L., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers* 1:005.  
2. Kole, R., Krainer, A.R., and Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery*.  
3. Kordasiewicz, H.B., Stanek, L.M., Wanczewicz, E.V., Mazur, C., McAlonis, M.M., Fyfe, K.A., Artzbe, J.W., Weiss, A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., et al. (2012). Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* 74, 1031-1044.  
4. Goyenvalle, A., Griffin, G., Babbs, A., Andalousi, S.E., Essat, K., Aviri, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Volt, T., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*.  
5. Robin, V., Griffin, G., Carter, J.-P.L., Leumann, C.J., Garcia, L., and Goyenvalle, A. (2017). Efficient SMN Rescue following Subcutaneous Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotide Treatment. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 7, 81-89.



**Titre :** Evaluation de différentes stratégies thérapeutiques antisens pour le traitement de la maladie de Huntington

**Mots clés :** Maladie de Huntington, oligonucléotides antisens, U7snRNA, thérapie

**Résumé :** La maladie de Huntington (MH) est causée par une expansion de répétitions CAG sur l'exon 1 du gène huntingtine (*HTT*), codant pour une protéine mutée. Il a été montré que la diminution d'expression de cette protéine est une piste thérapeutique très prometteuse. Dans ce projet, nous avons étudié et comparé trois approches dites « antisens » : une stratégie allèle non spécifique, visant à diminuer de manière générale l'expression de *HTT* ; une stratégie allèle spécifique ciblant les répétitions CAG afin d'impacter préférentiellement l'allèle muté ; et enfin une stratégie de saut d'exon permettant d'enlever des sites de clivage à l'origine d'une forme raccourcie et toxique de la protéine HTT. Nous avons évalué ces approches grâce à deux outils différents : les tricyclo-DNA (TcDNA), qui sont une nouvelle classe d'oligonucléotides antisens (AON) plus performante que les chimies précédentes,

et le système U7snRNA vectorisé, permettant d'induire une expression stable des séquences antisens. Dans un premier temps, ces différentes molécules ont été évaluées *in vitro* dans des lignées de fibroblastes de patients en quantifiant le niveau d'ARNm et de protéines HTT par RTqPCR et western blot respectivement. Par la suite, les séquences les plus efficaces *in vitro* ont été sélectionnées et les AON et AAV-U7snRNA correspondants ont été injectés en intracérébroventriculaire (ICV) dans un modèle murin de la MH (souris YAC128). Les résultats les plus encourageants ont été obtenus avec le TcDNA-NS (pour allèle Non Spécifique), permettant une diminution significative de l'expression de HTT dans le cortex, l'hippocampe et le striatum 2 et 6 semaines après une injection ICV. Ces résultats prometteurs suggèrent le potentiel des TcDNA comme nouvel outil thérapeutique pour la MH.

**Title:** Therapeutic strategies for Huntington's disease based on the antisense approach

**Keywords:** Huntington's disease, antisense oligonucleotides, U7snRNA, *silencing*, therapy

**Abstract:** Huntington's disease (HD) is caused by a CAG repeat expansion in the exon 1 of huntingtin gene (*HTT*), encoding for a mutant protein. It has been shown that the *silencing*/down regulation of huntingtin protein is a promising therapeutic lead. In this project, I have explored and compared three strategies using the antisense approach: a non-allele specific strategy, aiming to *silence* the global expression of *HTT*; an allele specific strategy targeting CAG repeats to silence preferentially the mutant allele; and an exon-skipping strategy in order to remove cleavage sites which originally cause a shorter and toxic form of the HTT protein. These strategies have been evaluated using two different tools: tricyclo-DNA (TcDNA), a new class of antisense oligonucleotides (AON) more efficient than the

previous chemistries, and a vectorized approach using U7snRNA system allowing a stable expression of antisense sequences. Firstly, these different molecules have been assessed *in vitro* in HD fibroblasts quantifying mRNA and HTT protein levels with RTqPCR and Western blot respectively. Subsequently, the most efficient sequences have been selected and intra-cerebroventricular (ICV) injections have been performed with corresponding AON and AAV-U7snRNA in a HD mouse model (YAC128). The most encouraging results have been obtained with the TcDNA-NS (for Non Specific allele), allowing a significant decrease of HTT expression in cortex, hippocampus and striatum 2 and 6 weeks after ICV injection. These promising results suggest the potential of TcDNA as a new therapeutic tool for HD.

